

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ HAFNER
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

ŠKOFJA LOKA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JERNEJ HAFNER

**ANALIZA TERMODINAMSKIH PARAMETROV VEZAVE ZAVIRALCEV
TRIPSINA Z IZOTERMNO TITRACIJSKO KALORIMETRIJO**

**ANALYSIS OF THERMODYNAMIC PARAMETERS OF BINDING OF TRYPSIN
INHIBITORS WITH ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

ŠKOFJA LOKA, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Zahvala

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Janezu Ilašu, mag. farm. za vodenje pri izdelavi magistrske naloge ter strokovne in življenske nasvete.

Svoji družini se zahvaljujem za vso podporo tekom študija.

Posebej pa bi se zahvalil Nini za spodbudo in razumevanje med pisanjem magistrske naloge in tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša, mag. farm.

Jernej Hafner

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Jurij Trontelj, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. TERMODINAMIKA VEZAVE	4
1.1.1. ENTALPIJSKI PRISPEVEK	4
1.1.2. VAN T HOFF-OVA ENAČBA	5
1.1.3. ENTROPIJSKI PRISPEVEK	6
1.2. ENTALPIJSKO-ENTROPIJSKA KOMPENZACIJA	8
1.3. NEKOVALENTNE INTERAKCIJE	9
1.3.1. IONSKE VEZI	9
1.3.2. VODIKOVE VEZI	9
1.3.3. DIPOLNE INTERAKCIJE	9
1.3.4. VAN DER WAALS-OVE INTERAKCIJE	10
1.3.5. HIDROFOBNE INTERAKCIJE	10
1.3.6. KATION-II IN II-II INTERAKCIJE	10
1.4. KALORIMETRIJA	11
1.5. IZOTERMNA TITRACIJSKA KALORIMETRIJA	13
1.5.1. PREDNOSTI IN SLABOSTI ITC	13
1.6. TRIPSIN	14
2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.2. METODE	19
3.2.1. PRIPRAVA RAZTOPIN	19
3.2.2. UMERJANJE pH METRA	21
3.2.3. NAČRTOVANJE TITRACIJE	22
3.2.4. UPORABA ITC	24
3.3. STRUKTURNE FORMULE TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV	29
4. REZULTATI	33
4.1. REZULTATI MERITEV, OPRAVLJENIH Z ITC	33
4.2. ENTROPIJSKI IN ENTALPIJSKI PRISPEVKI POSAMEZNIH TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV	35
5. DISKUSIJA	42
5.1. TESTNE TITRACIJE	42
5.2. VEZAVA TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV	42
5.3. MOŽNI VZROKI ZA NAPAKE PRI MERITVAH	46
6. SKLEP	48
7. VIRI IN LITERATURA	49

POVZETEK

Tripsin je serinska proteaza, ki ima v telesu pomembno funkcijo prebavnega encima. Sam običajno ni tarča delovanja zdravilnih učinkovin, pač pa reprezentativno predstavlja ostale serinske proteaze in se tako uporablja kot model, ko iščemo substrate in zaviralce teh encimov. Tako se v poskusih uporablja kot model za npr. plazmin, faktor Xa, urokinazo ali kot v našem primeru za trombin, ki je prav tako serinska proteaza in ima enako katalitično triado, Ser195, His57 in Asp102, kot tripsin. Trombin je kot tarča za zdravilne učinkovine zelo zanimiv, saj zaviranje njegovega delovanja predstavlja eno od možnosti antitrombotičnega zdravljenja.

V okviru magistrske naloge smo na izotermnem titracijskem kalorimetru izvedli titracije raztopin tripsina z različnimi tripsinskimi zaviralci in pridobili termodinamski opis vezave zaviralcev na tripsin.

Izotermna titracijska kalorimetrija je vsestransko uporabna eksperimentalna tehnika, ki se uporablja predvsem za termodinamsko karakterizacijo makromolekularnih interakcij. Z ustrezno načrtovano titracijo na izotermnem titracijskem kalorimetru lahko določimo konstanto disociacije (K_d), konstanto asociacije (K_a), spremembo Gibbsove proste energije (ΔG), spremembo entalpije (ΔH), spremembo entropije (ΔS) in stehiometrijo reakcije (n).

Ugotovili smo, da je vezava tripsinskih zaviralcev DMI 45, DMI 45H, DPD 89, DPD 89H, DPD 112, DPD 112H in KUT 462 entalpijsko vodena, pri vezavi zaviralcev DJI 95, DJI 95H, DMI 65H, DMI 66H, DMI 67H, DMI 68H, DMI 75H in DMI 76H pa sta entalpijski in entropijski prispevek uravnotežena. Vsem spojinam smo ob vezavi na tripsin izmerili negativno spremembo entalpije, kar je pričakovano, saj vse spojine vsebujejo benzamidinsko skupino, ki z Asp 189 tvori ionske interakcije in preko molekul vode v S1 žepu tripsina tvori H vezi. Večina spojin, ki so substituirane na mestu 6 1,4-benzoksazinskega ogrodja, so imele uravnotežen entalpijski in entropijski prispevek. Spojine, ki so substituirane na mestu 7 1,4-benzoksazinskega ali 1,4-benzodioksinskega ogrodja, pa so imele pretežno ugoden entalpijski in neugoden entropijski prispevek k vezavi. Spojine, ki so 3 in 4-fluoro substituirane na P3 fenilnem obroču so močnejši tripsinski zaviralci kot pa 3,4 in 3,5-difluoro substituirane spojine.

Ključne besede: izotermna titracijska kalorimetrija, inhibitorji tripsina, tripsin, termodinamika vezave

ABSTRACT

Trypsin is a serine protease that acts as an important digestive enzyme in the human body. Generally, trypsin itself is not a target of active pharmaceutical ingredients, but it is often used as a representative model of other serine proteases, while searching for their substrates. This way trypsin is used as a model for plasmin, factor Xa, urokinase or as in our case for thrombin. Same as trypsin, thrombin is serine protease with identical catalytic triad, consisting of Ser15, Hit57 and Asp102. Thrombin is very interesting target for active pharmaceutical ingredients, because its inhibition presents one of the possibilities for antithrombotic therapy.

In our study we titrated trypsin solutions with various trypsin inhibitors by using isothermal titration calorimetry. This way we obtained the thermodynamic properties of chosen inhibitors.

Isothermal titration calorimetry is widely used experimental technique for thermodynamic characterisation of molecular interactions. With carefully planned titration of isothermal titration calorimeter we can determine dissociation constant (K_d), association constant (K_a), Gibbs free energy changes (ΔG), enthalpy changes (ΔH), entropy changes (ΔS) and binding stoichiometry (n).

Our results show that trypsin inhibitors DMI 45, DMI 45H, DPD 89, DPD 89H, DPD 112, DPD 112H and KUT 462 indicate enthalpy-driven binding, while at DJI 95, DJI 95H, DMI 65H, DMI 66H, DMI 67H, DMI 68H, DMI 75H and DMI 76H enthalpy and entropy contributions are more balanced. All inhibitors showed negative change of enthalpy, which is expected, as they all include benzamidine group that binds to Asp189 in S1 pocket of trypsin by ion interactions and by H-bonds via water molecules. Most of the compounds with the P3 moiety at position 6 of the 1,4-benzoxazine scaffold had balanced enthalpic and entropic contribution. Compounds with the P3 moiety at the position 7 of the 1,4-benzoxazine or 1,4-benzodioxine scaffold had predominantly favourable enthalpic and unfavourable entropic contribution. Compounds with fluorine atom at position 3 or 4 of the P3 phenyl ring are more potent trypsin inhibitors than 3,4 and 3,5-difluoro substituted compounds.

Keywords: isothermal titration calorimetry, trypsin inhibitory, trypsin, binding thermodynamics

SEZNAM OKRAJŠAV

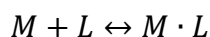
ΔC_p :	sprememba toplotne kapacitete
ΔG :	sprememba Gibbsove proste energije
ΔG° :	sprememba Gibbsove proste energije pri standardnih pogojih
ΔS° :	sprememba entropije sistema pri standardnih pogojih
DMSO :	dimetilsulfoksid
H :	entalpija
H° :	sprememba entalpije pri standardnih pogojih
ITC :	izotermni titracijski kalorimeter
K_a :	konstanta asociacije
K_d :	konstanta disociacije
L :	ligand
M :	makromolekula
n :	stehiometrija reakcije
R :	splošna plinska konstanta (8314 J/mol K)
S :	entropija
T :	temperatura (K)

1. UVOD

Linus Carl Pauling je nekoč dejal, da skrivnost življenja leži v medmolekularnem prepoznavanju, v zmožnosti molekule, da prepozna drugo molekulo skozi interakcijo s šibkimi kemijskimi silami [1]. Medmolekularno prepoznavanje je osnova vsem pomembnejšim procesom v biologiji - od encimskega prepoznavanja ustreznega substrata, prenosa celičnih signalov in medsebojnega prepoznavanja med celicami do nadzora nad transkripcijo in translacijo [2]. Pri medmolekularnem prepoznavanju nastajajo nekovalentni kompleksi, ki do določene mere disociirajo, s čimer pride do ravnotežja med prosto in vezano obliko. V ravnotežju makroskopski procesi sicer potekajo, vendar je njihova hitrost enaka ustreznim reverzibilnim procesom. Z merjenjem proste in vezane oblike lahko določimo moč molekularne interakcije.

Osnovno vezavo med ligandom in proteinom lahko opišemo s spodnjo enačbo, kjer M predstavlja makromolekulo in L ligand.

Enačba 1. Vezava med ligandom in proteinom.



M = makromolekula; L = ligand; M·L = nekovalentni kompleks med makromolekulo in ligandom.

Ravnotežno konstanto izračunamo s pomočjo enačbe 2.

Enačba 2. Ravnotežna konstanta nekovalentnega kompleksa med makromolekulo in ligandom.

$$K = \frac{[M \cdot L]}{[M][L]}$$

K = ravnotežna konstanta; [M·L] koncentracija vezane oblike makromolekule in liganda; [M] = koncentracija proste oblike makromolekule; [L] = koncentracija proste oblike liganda.

Ker je enačba 2 zapisana v smeri asociacije, lahko konstanto K poimenujemo asociacijska konstanta, K_a .

Enačba 3. Asociacijska konstanta nekovalentnega kompleksa med makromolekulo in ligandom.

$$K_a = \frac{[M \cdot L]}{[M][L]}$$

K_a = asociacijska konstanta; $[M \cdot L]$ koncentracija vezane oblike makromolekule in liganda; $[M]$ = koncentracija proste oblike makromolekule; $[L]$ = koncentracija proste oblike liganda.

Termodinamsko stabilnost kompleksa določa razlika med Gibbsovo prosto energijo kompleksa in Gibbsovo prosto energijo liganda in makromolekule [3]. Gibbsova prosta energija je hipotetična količina, ki nam pomaga oceniti spontanost reakcije. Če je njena vrednost negativna, bo reakcija vezave ali konformacijska sprememba potekala spontano (do mere, ki jo določa velikost ΔG). Če je pozitivna, reakcija ne bo potekala spontano. V tem primeru nam velikost ΔG pove, koliko energije je potrebno, da sprožimo potek reakcije.

Spremembo Gibbsove proste energije nam podaja enačba 4:

Enačba 4. Sprememba Gibbsove proste energije.

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[M \cdot L]}{[M][L]} \right)$$

ΔG = sprememba Gibbsove proste energije; ΔG° = sprememba Gibbsove proste energije pri standardnih pogojih; R = splošna plinska konstanta (8314 J/mol K); T = temperatura (K); $[M \cdot L]$ koncentracija vezane oblike makromolekule in liganda; $[M]$ = koncentracija proste oblike makromolekule; $[L]$ = koncentracija proste oblike liganda.

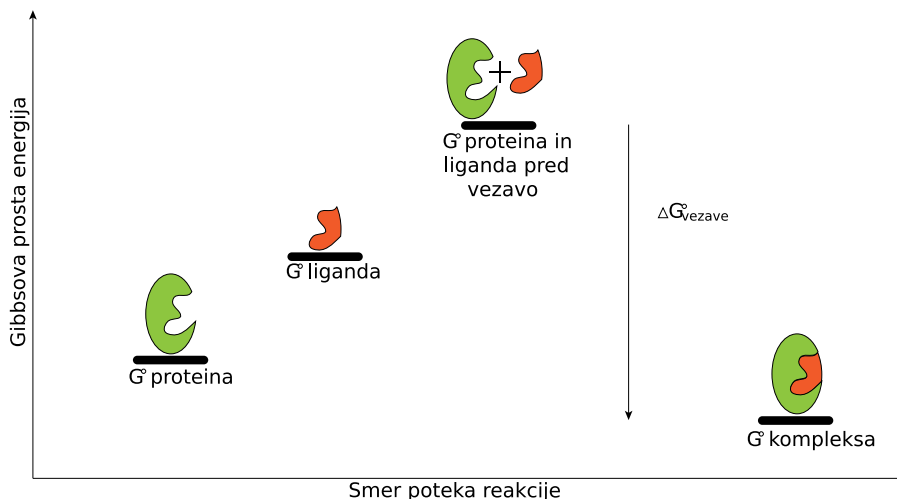
V ravnotežju, pri standardnih pogojih, ko je $\Delta G=0$, se enačba 4 spremeni v:

Enačba 5. Sprememba Gibbsove standardne proste energije

$$\Delta G^\circ = -RT \ln \left(\frac{[M \cdot L]}{[M][L]} \right) = -RT \ln K_a$$

ΔG° = sprememba Gibbsove standardne proste energije; R = splošna plinska konstanta (8314 J/mol K); T = temperatura (K); $[M \cdot L]$ koncentracija vezane oblike makromolekule in liganda; $[M]$ = koncentracija proste oblike makromolekule; $[L]$ = koncentracija proste oblike liganda; K_a = konstanta asociacije.

Sprememba Gibbsove standardne proste energije (ΔG°) je sprememba proste energije pri prevorbi 1 mola reaktantov v produkte, pod standardnimi pogoji (1M, 1 bar) [4]. V zgornjem primeru je ΔG sprememba proste energije, ko se 1 mol makromolekule veže z 1 molom liganda pod standardnimi pogoji. Sprememba standardne proste energije pri nastanku kompleksa se imenuje tudi standardna prosta energija vezave.



Slika 1: Gibbsova prosta energija vezave.

Pogosteje se moč vezave podaja s konstanto disociacije (K_d) kot pa s K_a , ker je vrednost K_d enaka kot koncentracija liganda, pri kateri je v ravnotežju polovica proteinskih molekul vezanih na ligand. Konstanta disociacije je obratno sorazmerna konstanti asociacije:

Enačba 6. Konstanta disociacije.

$$K_d = \frac{[M][L]}{[M \cdot L]} = \frac{1}{K_a}$$

K_d = konstanta disociacije; K_a = asociacijska konstanta; $[M \cdot L]$ koncentracija vezane oblike makromolekule in liganda; $[M]$ = koncentracija proste oblike makromolekule; $[L]$ = koncentracija proste oblike liganda.

Iz tega sledi, da je standardna prosta energija vezave:

Enačba 7. Standardna prosta energija vezave s K_d .

$$\Delta G^\circ = RT \ln K_d$$

ΔG° = sprememba Gibbsove proste energije pri standardnih pogojih; R = splošna plinska konstanta (8314 J/mol K); T = temperatura (K); K_d = konstanta disociacije.

Biološko pomembne nekovalentne interakcije imajo lahko zelo različne konstante disociacije. Tiste najmočnejše imajo K_d v pikomolarnem do nanomolarnem območju (10^{-12} - 10^{-9}), šibkejše pa v milimolarnem območju (10^{-3}). Če to pretvorimo v ustrezne spremembe standarne proste energije, ugotovimo, da ta znaša za močnejše interakcije okoli -50 kJ/mol in za šibkejše okoli -17 kJ/mol. Posebnost je vezava med biotinom in avidinom, ki je najmočnejša znana nekovalentna interakcija in katere K_d znaša okoli 1×10^{-15} ter ΔG okoli -84 kJ/mol [2].

1.1. TERMODINAMIKA VEZAVE

Sprememba Gibbsove proste energije je sestavljena iz entalpijskega in entropijskega prispevka.

Enačba 8. Entalpijski in entropijski prispevek h Gibsovi prosti entalpiji.

$$\Delta G^{\circ} = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$$

ΔG° = sprememba Gibbsove proste energije pri standardnih pogojih; ΔH° = sprememba entalpije pri standardnih pogojih; ΔS° sprememba entropije sistema pri standardnih pogojih; T = temperatura (K) [5].

Sprememba entalpije (ΔH) odraža količino energije, potrebne, da se doseže določeno stanje. Entropija (S) pa pove, kako lahko se bo ta energija porazdelila med različne molekulske energijske nivoje. Pri reakcijah vezave je pogosta negativna vrednost entalpije, saj se sistem s tvorbo vezi prestavi na nižje energijske nivoje. Po drugi strani pa je vrednost entropije pri reakcijah vezave običajno pozitivna, kar je posledica naravne težnje k večjemu neredu [6].

1.1.1. ENTALPIJSKI PRISPEVEK

Sprememba entalpije (ΔH) je posledica nastanka in cepitve mnogih posameznih vezi, prekinitve interakcij med ligandom in topilom (H-vezi in vdW vezi), prerazporeditve intramolekularnih H-vezi proteina, prerazporeditve molekul topila ob površini proteina, konformacijskih sprememb v vezavnem mestu, itd. Pri tem se upošteva interakcije s topilom kot referenco [7]. Ti prispevki lahko vplivajo ugodno ali neugodno na vezavo. Negativna (ugodna) ΔH nastane, ko moč interakcij med interagirajočima molekulama preseže moč interakcije med posamezno molekulo in topilom [8].

Poleg van der Waals-ovih in elektrostatskih interakcij na spremembo entalpije najbolj vplivajo H-vezi. Optimalna entalpija vezave ne korelira samo s številom akceptorjev in donorjev H-vezi, temveč tudi z relativno kvaliteto tvorjenih vodikovih vezi, glede na tiste tvorjene s topilom [6].

Ugoden entalpijski prispevek je indikacija specifičnih interakcij med ligandom in tarčo in je merilo za specifičnost, selektivnost in prilagodljivost liganda. Neugoden entalpijski prispevek pa kaže na nespecifične interakcije med ligandom in tarčo.

Optimizacijo vezavne entalpije otežuje nezanemarljiva in neugodna desolvacijska entalpija polarnih skupin. Polarna skupina mora tvoriti močno interakcijo s tarčo, da nadoknadi izgubljeno desolvacijsko entalpijo [9].

Connelly s sodelavci so leta 1993 z izvedbo titracij v vodi in devteriju ugotovili, da je za velik del ΔH odgovorna hidracija kompleksa [10]. Pogosto voda, ki se nahaja na vmesnih površinah kompleksa, pomaga izboljšati komplementarnost površin s tem, da podaljša mrežo H vezi. S tem ugodno prispeva k entalpiji, a ji nasprotuje neugoden entropijski prispevek. Z dodajanjem osmotsko aktivnih snovi in s tem zmanjšanjem aktivnosti vode so proučevali vlogo medfazne vode. Ugotovili so, da so kompleksi z nizko stopnjo površinske komplementarnosti in brez medfazne vode odporni na dodatek osmotsko aktivnih snovi [11].

1.1.2. VAN'T HOFF-OVA ENAČBA

Spremembo entalpije lahko določimo posredno s pomočjo van't Hoff-ove enačbe, za kar pa moramo izmeriti ravnotežno konstanto pri različnih temperaturah. Vendar se moramo zavedati, da enačba stoji na predpostavki, da se ΔH° in ΔS° ne spreminjata v proučevanem temperaturnem razponu, kar se le redko zgodi. Tako je že več raziskav potrdilo odstopanja med spremembami entalpije izračunanih z van't Hoff-ovo enačbo in tistimi izmerjenimi z izotitracijsko kalorimetrijo [12][13][14].

Če želimo dobiti enačbo za izračun spremembe entalpije, moramo združiti enačbi 5 in 9, da dobimo:

$$-RT \ln K_a = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

In nato preuredimo v van't Hoffovo enačbo:

Enačba 9. Van't Hoffova enačba.

$$\ln K_a = \left(\frac{-\Delta H^\circ}{R} \right) \left(\frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

K_a = konstanta asociacije; ΔH° = sprememba entalpije pri standardnih pogojih; ΔS° = sprememba entropije sistema pri standardnih pogojih; T = temperatura (K).

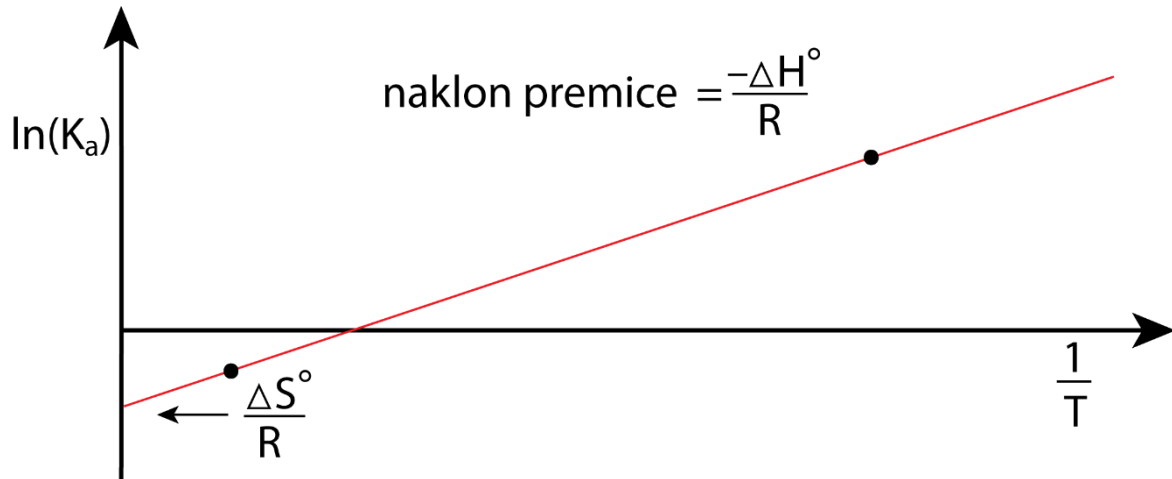
Če van't Hoff-ovo enačbo zapišemo za dve različni konstanti ravnotežja (pri različnih temperaturah) in nato odštejemo eno od druge, dobimo enačbo za izračun spremembe entalpije:

Enačba 10. Van't Hoffova enačba za izračun spremembe entalpije.

$$\ln \left(\frac{K_{a1}}{K_{a2}} \right) = \left(\frac{\Delta H^\circ}{R} \right) \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right)$$

K_{a1} = konstanta asociacije pri pogoju 1; K_{a2} = konstanta asociacije pri pogoju 2; ΔH° = sprememba entalpije pri standardnih pogojih; T_1 = temperatura pri pogoju 1 (K); T_2 = temperatura pri pogoju 2 (K).

Spremembo entalpije lahko razberemo tudi iz grafa (slika 2) [15].



Slika 2: Grafični izračun spremembe entalpije.

1.1.3. ENTROPIJSKI PRISPEVEK

Sprememba entropije ob vezavi je povezana z dinamiko in prožnostjo sistema. Odvisna je predvsem od spremembe solvatacijskih energij ter konfiguracijskih sprememb tako liganda kot proteina [16].

Enačba 11. Sprememba entropije

$$\Delta S^\circ = \Delta S^\circ \text{ solvatacijska} + \Delta S^\circ \text{ konfiguracijska}$$

$$\Delta S^\circ = \text{sprememba entropije pri standardnih pogojih.}$$

Ko se molekula veže na protein, postane manj mobilna in pride do izgube konfiguracijske entropije, ki nasprotuje vezavi. Koliko entropije se izgubi ob vezavi, je odvisno od vsakega liganda in makromolekule posebej. Sistemi z nizko afiniteto vezave so podvrženi nižjim entropijskim izgubam kot tisti z visoko afiniteto. Izjema je interakcija med biotinom in streptavidinom, kjer je opažena relativno majhna izguba entropije ob vezavi [17].

Sprememba konfiguracijske entropije lahko prispeva več ovir k vezavi. Prva ovira je posledica izgube rotacijskih in translacijskih stopenj svobode ob vezavi. Vsaj šest stopenj svobode se izgubi ob nastanku kompleksa. Po nekaterih virih lahko ta energijska ovira znaša tudi do +62,8 kJ/mol [6]. Drugo oviro predstavlja izguba vibracijske entropije, ki je lahko v nekaterih primerih še večja od izgube rotacijske in translacijske entropije. Tretja ovira

nastane zaradi omejitve individualne rotacije vezi ob vezavi v kompleks, ki znaša okoli 2,5 kJ/mol na (vrtljivo) vez [17]. To oviro se da zmanjšati z načrtovanjem rigidnih vezi v strukturo liganda. S tem zmanjšamo število rotamerov liganda in entropijsko oviro pri tvorbi kompleksa. Raziskave kažejo, da lahko povečamo ligandovo vezavno afiniteto od 2,9 do 6,7 kJ/mol za vsako vez, ki ji omejimo rotacijo [16]. Za to moramo imeti na razpolago ustrezne strukturne podatke, da lahko zagotovimo natančno ujemanje liganda z receptorskim mestom.

Znani pa so tudi primeri, ki so v nasprotju z zgoraj opisanim principom. *DeLorbe s sodelavci* so z namenom izboljšanja entropije ob vezavi na GRB2 receptor ciklizirali serijo psevdopeptidov. V nasprotju s pričakovanji se negativni entropijski prispevek ni zmanjšal, temveč se je povečal entalpijski prispevek. Razlog bi lahko bilo večje število direktnih polarnih stikov med cikliziranim ligandom in proteinom, kar izboljša entalpijo [18].

Največji vpliv na ΔS ima topilo. Prekritje vodi dostopne molekulske površine privede do sprostitve medfaznih molekul vode. Molekulam vode se tako poveča število prostostnih stopenj gibanja, kar vodi v večjo entropijo. Sprememba solvatacijske entropije je ugodna (pozitivna), če je površina, ki se je ob vezavi prekrila, hidrofobna. Izjema je voda okoli ionskih skupin, ki ima skupni nižji molarni volumen in molarno entropijo, kot pa preostala voda. Ko se ob vezavi tem ionskim skupinam približajo nasprotno nabite skupine, se voda sprostí, kar poveča molarni volumen in molarno entropijo [19]. Torej pozitivna sprememba entropije običajno kaže na sprostitvev molekul vode s površine kompleksa.

Po drugi strani pa sta Fischer in Verma leta 1999 dokazala, da lahko medfazne molekule vode, ki se po vezavi ne sprostijo, pozitivno prispevajo k celokupni entropiji interakcije. Razlog za ta pojav naj bi bil, da medfazna voda oslabi intramolekularne interakcije proteina, ter tako poveča njegovo fleksibilnost. V svoji raziskavi z govejim pankreatičnim tripsinskim zaviralcem sta ob nastanku kompleksa izmerila 69% manj intramolekularnih nekovalentnih interakcij, kot pa pri nevezani obliki proteina, kar je privedlo do povečanja vibracijske entropije [20].

1.2. ENTALPIJSKO-ENTROPIJSKA KOMPENZACIJA

Entalpijski in entropijski prispevek sta povezana. Povečanje entalpije zaradi močnejše vezave lahko omeji gibljivost interagirajočih molekul in s tem zmanjša entropijo sistema. Vendar to ni univerzalno pravilo, saj v nasprotnem primeru optimizacija vezavne afinitete sploh ne bi bila možna, saj bi vsaki ugodni ΔH nasprotovala neugodna ΔS . Proteini nadomestijo neugodne entropijske prispevke ob vezavi liganda tako, da povečajo svojo dinamiko na delih oddaljenih od vezavnega mesta. Prilagodljiva vezavna mesta potrebujejo tudi bolj prilagodljive ligande kot pa rigidna vezavna mesta. Programi za molekulsko modeliranje večinoma zanemarijo prilagodljivost proteina ali receptorja, vendar s to poenostavitvijo ignorirajo entalpijsko-entropijsko kompenzacijo [11].

Dve različni spojini se lahko vežeta na isto tarčo z enako afiniteto, vendar z različnim mehanizmom vezave. Pri eni je lahko vezava entropijsko vodena in pri drugi entropijsko. Entropijsko vodene reakcije dobijo večino svoje vezavne energije iz nespecifičnega hidrofobnega efekta, entalpijske pa z vzpostavljanjem močnih in specifičnih vodikovih vezi s tarčo. Do zanimive ugotovitve sta leta 1992 prišla znanstvenika Searle in Williams, in sicer da je vezava agonistov vodena večinoma entalpijsko in vezava antagonistov večinoma entropijsko [21].

Primer entropijske optimizacije liganda so prva generacija zaviralcev HIV-1 proteaze. Vezava teh zaviralcev je entropijsko vodena, njihova vezavna entalpija pa je rahlo negativna (ritonavir) ali pozitivna (indinavir, nelfinavir, saquinavir) [22]. Glavni vzrok za tako veliko ugodno entropijo ob vezavi je prekritje velikih hidrofobnih površin ob vezavi [23].

Skozi leta so znanstveniki dokazali, da je možno razviti entalpijsko in entropijsko optimizirane ligande za isto vezavno mesto. Znanstveniki so potrebovali 10 let, da so entropijsko vodene zaviralce HIV-1 proteaze optimizirali do entalpijsko vodenih (Darunavir) [23][24]. Druga generacija zaviralcev HIV-1 proteaze (KNI 764) doseže največjo vezavno afiniteto z $\Delta H = -31,8$ kJ/mol in $-T\Delta S = -28,0$ kJ/mol [22].

S tem, ko vnesemo fleksibilne in asimetrične funkcionalne skupine v bližino področij, ki so nagnjena k mutacijam, izboljšamo odpornost zaviralca na mutacije [25][26]. Tako povečamo fleksibilnost zaviralca in mu omogočimo, da nadomesti izgubljene interakcije zaradi mutacije vezavnega mesta tako, da skrije del svoje površine pred topilom [26].

1.3. NEKOVALENTNE INTERAKCIJE

Nekovalentne interakcije so odgovorne za inter- in intramolekularno prepoznavanje tako med proteini samimi kot tudi med proteini in ligandi. Te interakcije vključujejo ionske vezi, vodikove vezi, dipolne interakcije, van der Waals-ove interakcije, hidrofobne interakcije ter kation- π in π - π interakcije.

1.3.1. IONSKE VEZI

Ionske vezi se tvorijo med ioni ali molekulami z nasprotnim nabojem. Za razliko od kovalentnih ali vodikovih vezi, ionske vezi nimajo določene geometrijske orientacije, ker je elektrostatsko polje enotno v vseh smereh. Večina ionskih spojin je topnih v vodi zaradi veliko energije (hidratacijska entalpija), ki se sprosti, ko ioni vežejo molekule vode. Soli kot Na^+Cl^- se v vodi raztopijo, ker je hidratacijska entalpija večja od mrežne entalpije, ki stabilizira kristalno strukturo. Določene soli kot $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pa so praktično netopne v vodi, ker močni naboji na Ca^{2+} in PO_4^{3-} ustvarijo mrežno entalpijo, ki je večja od hidratacijske. Moč ionske vezi znaša okoli 20 kJ/mol [27].

1.3.2. VODIKOVE VEZI

Vodikove vezi nastanejo med močno elektronegativnim atomom, ki ima vsaj en prosti elektronski par, in vodikovim atomom, ki je kovalentno vezan na elektronegativen donorski atom. Vodikove vezi so usmerjene. Vodikove vezi, kjer donorski, vodikov in akceptorski atom v ležijo v ravni liniji, so močnejše od nelinearnih. Moč vodikove vezi je lahko med 4 in 40 kJ/mol. V proteinih in nukleinskih kislinah je njihova moč od 4,2 do 8,4 kJ/mol, kar je dosti šibkejše od vodikovih vezi med vodnimi molekulami [28].

1.3.3. DIPOLNE INTERAKCIJE

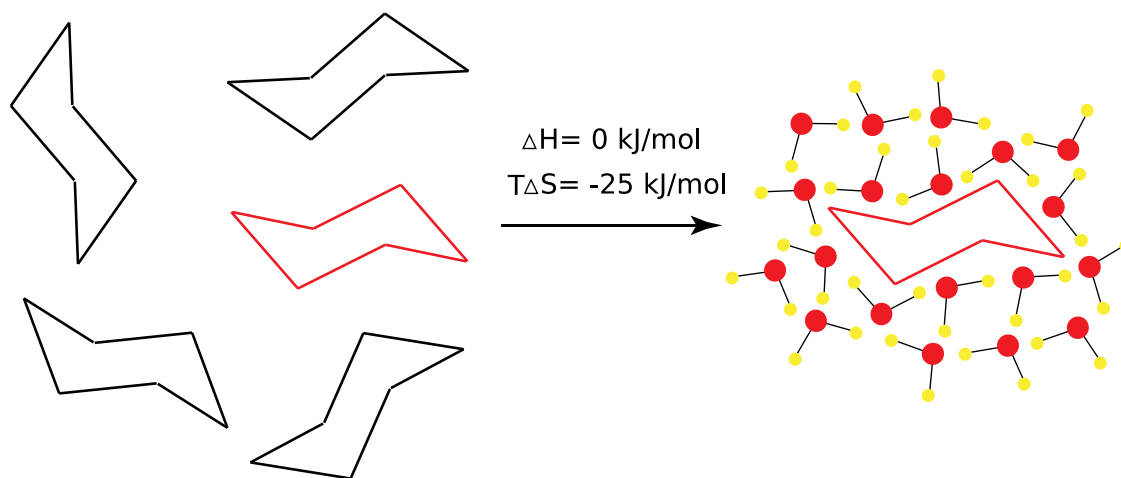
Dipolne interakcije so interakcije med molekulami s stalnim električnim dipolom ali med molekulami s stalnim električnim dipolom in molekulami z induciranim električnim dipolom ter kationi ali anioni. V molekuli, ki vsebuje atome z različno elektronegativnostjo, imajo atomi z najnižjo elektronegativnostjo pozitivne delne naboje in obratno. Velikost delnih nabojev v molekuli in razdalje med njimi določajo dipolni moment molekule. Moč dipolnih interakcij je odvisna od orientacije dipolnih momentov in razdalje med njimi. Pojavljajo se tako pri polarnih kot tudi pri nepolarnih molekulah [11][29].

1.3.4. VAN DER WAALS-OVE INTERAKCIJE

So nespecifične interakcije, ki so posledica trenutnih nihanj distribucije elektronov, kar pripelje do prehodno neenake elektronske gostote in prehodnega električnega dipola. Moč van der Waals-ovih interakcij hitro pada z razdaljo, zato so te interakcije možne le, ko so atomi blizu skupaj, v van der Waals-ovem kontaktu. Njihova moč (0,1-4 kJ/mol) je sorazmerna molski molski masi in kontaktni površini [11].

1.3.5. HIDROFOBNE INTERAKCIJE

Hidrofobne interakcije so pojavijo med nepolarnimi molekulami v vodnem mediju. So posledica molekularne strukture vode, same hidrofobne molekule imajo le pasivno vlogo. Molekularne interakcije med nepolarnimi molekulami in vodo so ravno tako ugodne kot med samimi nepolarnimi molekulami. Razlog za nastanek hidrofobnih interakcij je izguba rotacijskih in translacijskih stopenj svobode molekul vode, ki se nahajajo ob površini hidrofobne molekule in tvorijo vodikove vezi z okoliškimi molekulami vode. Te interakcije so usmerjene, saj voda ne more tvoriti vodikovih vezi z nepolarno molekulo, kar pripelje do znižanja entropije medfaznih molekul vode [11][30][31].



Slika 3: Prenos 1 mola ciklohesana v vodni medij (povzeto po [31]).

1.3.6. KATION- π IN π - π INTERAKCIJE

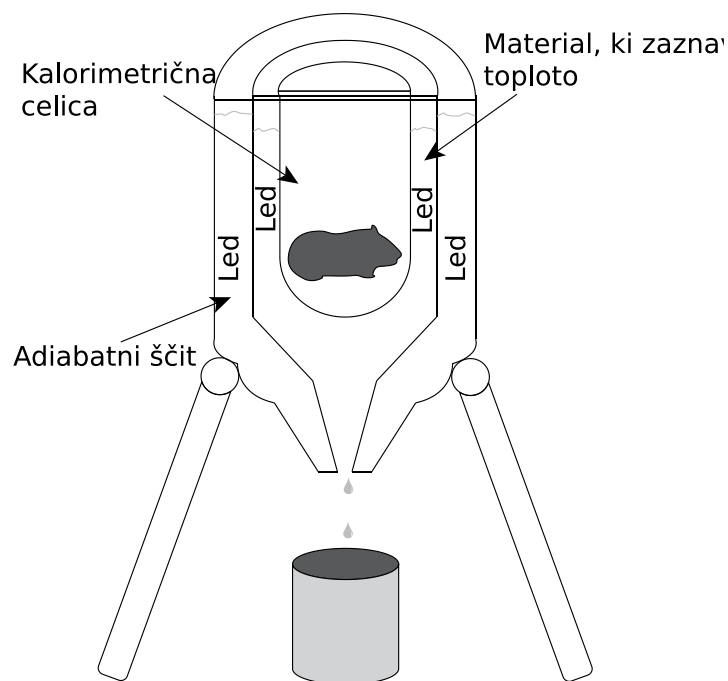
Kation- π in π - π interakcije so interakcije med kationi in π orbitalami konjugiranih molekul ali med π orbitalami samih konjugiranih molekul. Najbolj stabilne kation- π interakcije so tiste, v katerih je kation postavljen neposredno nad π sistem in je v van der Waalsovem kontaktu z njim. Manjši ioni tvorijo zaradi bolj zgoščenega naboja močnejše interakcije od večjih. Elektron donorske skupine na obroču povečajo π interakcije, medtem ko jih elektron privlačne oslabijo. Po jakosti so kation- π interakcije primerljive z vodikovimi vezmi [32].

1.4. KALORIMETRIJA

Besedo kalorimetrija je leta 1780 skoval Antoine Lavoisier, in sicer iz latinske besede *calor* (toplota) in grške besede *μέτρον/metron* (meriti) [33].

Kalorimeter je naprava, ki direktno in kvantitativno meri toploto reakcije [34]. Začetki sodobne kalorimetrije segajo v leto 1780, ko je škotski kemik Joseph Black osnoval pojma specifične toplote (toplota, ki je potrebna, da se snov pri konstantnem tlaku segreje za 1 K) in latentne toplote (toplota, ki jo telo prejme ali odda pri prehajanju iz enega v drugo agregatno stanje, ne da bi se mu pri tem spremenila temperatura) [35]. Poleg tega je dokazal razliko med toploto in temperaturo. Toploto je definiral kot energijo, ki se lahko prenaša, ko molekule vibrirajo, se premikajo ali trkajo druga v drugo, temperaturo pa kot povprečje kinetične energije molekul [36].

Prvi praktični kalorimeter sta leta 1780 izdelala Antoine Lavoisier in Pierre-Simon Laplace. V enem izmed svojih prvih eksperimentov sta določila entalpijo sežiga ogljika in ugotovila, da “*sežig 1 unče ogljika stali 6 funtov in 2 unči ledu*”. Iz teh podatkov sta izračunala, da entalpija sežiga ogljika znaša $-413,6$ kJ/mol, kar je presenetljivo blizu vrednosti, ki jo izmerimo s sodobnimi napravami ($-393,5$ kJ/mol). Istega leta je Lavoisier s pomočjo ledenega kalorimetra izmeril sproščeno toploto metabolizma budre. V kalorimetrično celico obdano z ledom je vstavil budro in preko merjenja količine staljene vode določil toploto reakcije [35]. Če bi meril tudi število kapljic vode na enoto časa, bi lahko pridobil tudi kinetične podatke o vzorcu, saj je stopnja nastajanja kapljic vode kvantitativno proporcionalna sproščeni toploti vzorca. Že iz tega preprostega eksperimenta je razvidno, da kalorimeter omogoča termodinamsko in kinetično analizo vzorca. Za razliko od sodobnih kalorimetrov je bil ledeni kalorimeter zmožen meriti le eksotermne reakcije [37][38].



Slika 4: Shema Lavosierjevega ledenega kalorimetra (povzeto po [39]).

Vse do poznih petdesetih let prejšnjega stoletja so bili raziskovalci primorani uporabljati lastne kalorimetre. Tako je bila prva naloga vsakega raziskovalca na področju kalorimetrije načrtovanje in izdelava kalorimetra. Med letoma 1930 in 1960 je bilo objavljenih več kot 300 člankov na temo reakcijske kalorimetrije in opisanih 200 različnih kalorimetrov. Ko so se po letu 1960 pojavili prvi komercialno dostopni kalorimetri, se je fokus kalorimetrije prevesil od kvantitativnih termodinamskih meritev na čistih materialih, proti kvalitativnim meritvam kompleksnih sistemov. Predvsem vedno več biologov je pričelo uporabljati kalorimetre za opazovanje bioloških procesov [40].

Pred približno 50 leti sta Christensen in Izatt prvič opisala titracijsko kalorimetrijo, in sicer kot metodo za simultano določanje K_a in spremembo entalpije (ΔH). Na začetku so to metodo uporabljali pri nevtralizacijah šibkih kislin/baz in pri kompleksacijah kovinskih ionov. K_a , ki so jo lahko določili s takratnimi napravami, je bila omejena na vrednosti manjše od 10^4 - 10^5 M^{-1} . Za določanje večjih K_a bi potrebovali bolj razredčene raztopine, kar pa je bil problem, saj takratni kalorimetri niso bili dovolj občutljivi [35]. Prve komercialno dostopne titracijske kalorimetre je leta 1989 izdelalo podjetje MicroCal in jih oglaševalo kot “naprava za določanje K v minuti” [39]. Izraz izotermna titracijska kalorimetrija pa so leta 1990 skovali Freire s sodelavci [41].

1.5. IZOTERMNA TITRACIJSKA KALORIMETRIJA

ITC meri nastalo ali porabljeno toploto ob vezavi makromolekule. Pri titraciji liganda v raztopino makromolekule preko merjenja izmenjave toplote, določi K_d , K_a , ΔG , ΔH , ΔS in n . ITC je edina eksperimentalna tehnika, ki omogoča določitev vseh naštetih parametrov v enem samem eksperimentu [42]. Glede na to, da ITC omogoča celoten termodinamski opis proučevanega sistema, je metoda široko uporabljena pri proučevanju bioloških sistemov [43].

V vzorčno celico vstavimo raztopino biomolekule, v pipeto pa raztopino liganda v enakem pufru. Ko se raztopina liganda v majhnih volumnih injicira v vzorčno celico, naprava zabeleži vse toplotne spremembe. Detektira jih preko merjenja spremembe dovedene moči potrebne za ohranjanje izotermnih pogojev med vzorčno in referenčno celico. Eksotermne reakcije povzročijo znižanje dovedene moči in endotermne povišanje dovedene moči. Zaporedno se opravi več injiciranj in toplotni signali se tekom injiciranja zmanjšujejo saj se vezana mesta na biomolekuli zasitijo. Če je eksperiment zasnovan pravilno so toplotni signali na koncu konstantni in predstavljajo toploto mešanja [38].

Najnovejši kalorimetri potrebujejo manj kot 500 μg proteina na titracijo in lahko zaznajo zelo majhne toplotne spremembe (0,1 μcal), ter s tem določijo konstante asociacije vse do 10^8 - 10^9 M^{-1} [44].

1.5.1. PREDNOSTI IN SLABOSTI ITC

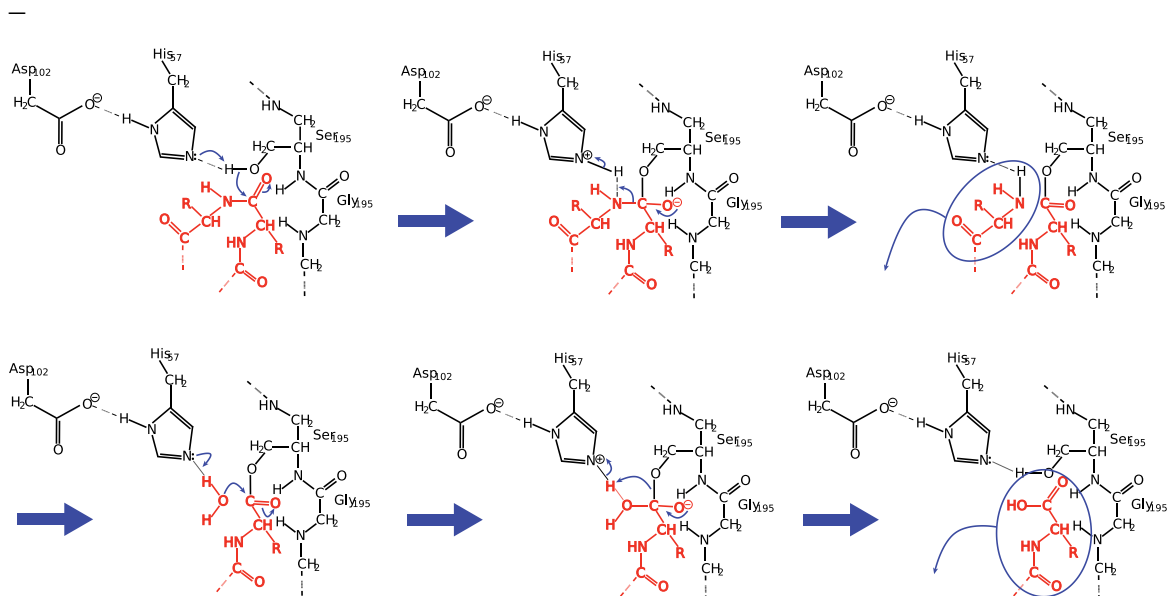
Obstaja več razlogov za porast priljubljenosti ITC na področju proučevanja proteinov. Glavna prednost ITC-ja je, da lahko dobimo celoten termodinamski profil v enem samem eksperimentu. Eksperimenti lahko potekajo v fizioloških pufrih, ni potrebno upoštevati površinskih vplivov in snovi v interakciji ni potrebno imobilizirati ali označiti. Poleg tega molekulska masa ne predstavlja omejitve in čeprav lahko določimo enake K_a pri seriji proteinskih reakcij, lahko s pomočjo ΔH in ΔS podrobneje ovrednotimo posamezne reakcije.

ITC ima tudi določene omejitve. Topnost makromolekule in liganda mora biti zadovoljiva in oba morata biti topna v enakem pufrskem sistemu. Potrebne se relativno velike količine proteina. ITC je omejena predvsem na proučevanje ligandov z visoko afiniteto do vezave, saj bi ligandi z nizko afiniteto za izvedbo titracije potrebovali zelo visoke koncentracije proteina. Ena od slabosti ITC je tudi potreben čas in delo za izvedbo eksperimenta. V primerjavi z drugimi metodami za merjenje afinitete je metoda časovno zelo potratna. Celo izkušeni operater lahko opravi le par meritev na dan.

1.6. TRIPSIN

Tripsin (23,3 kDa) je serinska proteaza, ki ima v telesu pomembno funkcijo prebavnega encima. Neaktivno obliko proencima (tripsinogen) sintetizirajo acinarne celice trebušne slinavke, ki se nato shranjuje v sekretornih granulah. Od tu se izloči v dvanajstnik, kjer enteropeptidaze odcepijo N-terminalno zaporedje proencima, s čimer povzročijo konformacijsko spremembo proteina in ga pretvorijo v aktivno obliko. Tripsin lahko povzroči tudi avtoaktivacijo – njegova aktivna oblika aktivira enterokinaze in tako spodbudi pretvorbo proencima v aktivno obliko. Tripsin razgrajuje proteine, in sicer tako, da cepi peptidno vez za argininom ali lizinom. Prav tako aktivira proencime drugih prebavnih encimov, kot sta npr. kimotripsin in elastaza, s čimer prispeva k razgradnji zaužitih proteinov. Izoelektrična točka tripsina znaša od 11.0 do 11.4. Tripsin najdemo pri številnih živalskih vrstah tako v anionski kot v kationski obliki [45][46]. Pri človeku večji delež zavzema kationska oblika – tripsinogen 1 predstavlja približno 13% proteinov pankreatičnega soka, medtem ko je tripsinogen 2 neaktivna oblika anionskega tripsina in predstavlja približno 6% proteinov v pankreatičnem soku. Majhen odstotek predstavlja tudi mezotripsin, ki se poleg pankreatičnega soka pojavlja tudi v možganih in je odporen na večino do zdaj znanih tripsinskih zaviralcev [47].

Tripsin torej hidrolizira amidne vezi proteinov in peptidov na C-terminalnem koncu lizinskih ali argininskih aminokislinskih ostankov. Poleg tega lahko cepi tudi ostale acilne komponente, kot so amidi, anilidi, estri, tioestri in fosfonati. Njegovo aktivno mesto sestoji iz katalitske triade aminokislinskih ostankov: Ser195, His57 in Asp102. Cepitev amidne ali estrske vezi poteka tako, da se tripsin in substrat povežeta v kompleks encim substrat. Temu sledi acetilacija, pri čemer Ser195 napade karbonilno skupino substrata in tako pride do nastanka kovalentno vezanega kompleksa intermediata (E-Ac), pri čemer aktivno mesto zapusti aminska ali alkoholna skupina. Proces se zaključi z deacilacijskim korakom, pri čemer His57 aktivira molekulo vode, da napade acilencim, regenerira prosti encim in sprosti karboksilni del začetnega substrata. Acilacija in deacilacija potekata tekom kratkotrajne formacije tetraedričnih intermediatov, ki jih stabilizirata aminokislinska ostanka Gly193 in Ser195, ki tvorita oksianionski žep [48].



Slika 5: Hidroliza amidne vezi v aktivnem mestu tripsina (povzeto po [49]).

Tripsin sam običajno ni tarča delovanja zdravilnih učinkovin, pač pa reprezentativno predstavlja ostale serinske proteaze in se tako uporablja kot model, ko iščemo substrate in zaviralce teh encimov. V primerjavi z ostalimi fiziološko pomembnimi serinskimi proteazami ima manj aminokislinskih ostankov, zaradi česar je bolj priročen pri samih laboratorijskih eksperimentih kot tudi pri računalniških metodah. Tako se v poskusih uporablja kot model za npr. plazmin, faktor Xa, urokinazo ali kot v našem primeru za trombin [50]. Trombin je tako kot tripsin serinska proteaza in oba s katalitično triado Ser195, His57 in Asp102 cepita peptidno vez. Čeprav je katalizirana reakcija identična, tripsin in trombin sodelujeta v različnih bioloških procesih. Tripsin ima vlogo pri prebavi, trombin pa sodeluje v kaskadi strjevanja krvi. S pretvorbo topnega fibrinogena v netopni fibrin in agregacijo trombocitov omogoči celjenje ran, a tudi nastanek patološkega strdka. Hkrati okrepi prekoagulacijski proces z aktiviranjem faktorjev strjevanja V, VIII, XI in XII. Kot tarča za zdravilne učinkovine je zanimiv, saj bi z njegovim zaviranjem lahko zdravili tromboze. Pri teh učinkovinah pa je nato pomembna selektivnost, da bi se izognili njihovim interakcijam s tripsinom. Trombin in tripsin imata v žepu S1 pozitivno nabite funkcionalne skupine (Asp189), na katere se substrat veže z ionskimi vezmi. V S3 žepu so možne aromatske interakcije. Trombin ima za razliko od tripsina podaljšano 60-zanko, ki ščiti S2 žep pred okolico (topilom). Pri obeh encimih pa se v bližini katalitične triade nahaja oksianionski žep [51][52].

2. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Izotermna titracijska kalorimetrija je edina eksperimentalna tehnika, ki omogoča določitev vseh pomembnejših termodinamskih parametrov v enem samem eksperimentu.

Namen našega raziskovalnega dela je preučiti termodinamske parametre vezave tripsinskih zaviralcev na tripsin. Rastopine tripsina bomo v izotermnem titracijskem kalorimetru titriral z različnimi tripsinskimi zaviralci, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo. Direktno in kvantitativno bomo določili spremembo toplote pri titraciji in pridobili podatke o K_d , K_a , ΔG , ΔH , ΔS in n reakcije.

Iz dobljenih podatkov bomo lahko ugotovili, ali je vezava zaviralcev na tripsin entalpijsko ali entropijsko vodena.

Preučili bomo vpliv posameznih strukturnih delov tripsinskih zaviralcev na termodinamiko vezave.

Primerjali bomo dobljene konstante inhibicije tripsina s konstantami inhibicije, ki so jih določili raziskovalci pred nami.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Preglednica I: Seznam uporabljenih materialov.

Tween® 20	Sigma-Aldrich, ZDA
Ultra čista demineralizirana voda, pridobljena z Milli Q – Advantage A10, TOC: 5 µg/L, specifična upornost: 18,2 MΩcm	Merck Millipore, USA
NaCl	Scharlau Science Group, Španija
NaCl	Merck KGaA, Nemčija
NaOH	Merck KGaA, Nemčija
DMSO	Sigma-Aldrich, ZDA
trypsin	Sigma-Aldrich, ZDA
KHCO ₃	Merck KGaA, Nemčija
HCl	Merck KGaA, Nemčija
Hepes (≥99,5%)	Fischer Scientific, ZDA
Ultra čista voda	Fakulteta za farmacijo, Slovenija
CH ₃ OH	Merck KGaA, Nemčija
Conrad 70	Decon Labs, USA
Vibracijsko mešalo, Vibramix 10 Vortex	Tehtnica, Slovenija
Magnetno mešalo	Tehtnica, Slovenija
pH meter, MA 5750	Iskra, Slovenija
Ultrazvočna kadička, Sonis 4	Iskra, Slovenija
Polavtomatska pipeta 0,5-10 µL	Biohit, Finska
Polavtomatska pipeta 2-20 µL	Biohit, Finska
Polavtomatska pipeta 20-200 µL	Biohit, Finska
Polavtomatska pipeta 200-1000 µL	Biohit, Finska
Tehtnica AG 245	Mettler Toledo, Švica
Pipetni nastavki 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Biohit, Finska
Plastične epruvete 1,5 mL in 2 mL	Eppendorf, Nemčija

Steklovina	
Vakumski razplinjevalec	TA Insrtuments
Plastične centrifugirke 15 mL in 50 mL	TPP, Švica
Tehtnica PB403-S	Mettler Toledo, Švica
Merilna pipeta 1 mL, 10 mL, 50 mL	Witeg, Nemčija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Hladilnik (+5 °C)	Gorenje, Slovenija

3.2. METODE

3.2.1. PRIPRAVA RAZTOPIN

- priprava 150 mM KHCO₃

Z analitsko tehtnico zatehtamo 1,5018 g KHCO₃ in ga prenesemo v 100 mL bučko. Z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 1 M HCl

100 mL bučko napolnimo s približno 50 mL demineralizirane vode in z merilno pipeto dodamo 8,29 mL 37% HCl. Nato premešamo in z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 150 mM HCl

100 mL bučko napolnimo s približno 50 mL demineralizirane vode in ji z merilno pipeto dodamo 15,0 mL 1M HCl. Nato premešamo in z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 5 mM KHCO₃

Z merilno pipeto odmerimo 1,0 mL 150 mM KHCO₃ in prenesemo v 50 mL bučko. Nato z merilno pipeto odmerimo 29,0 mL demineralizirane vode in prenesemo k 1,0 mL 150 mM KHCO₃.

- priprava 1 mM HCl

Z merilno pipeto odmerimo 149 mL demineralizirane vode in prenesemo v 250 mL bučko. Nato z merilno pipeto odmerimo 1,0 mL 150 mM HCl in prenesemo k 149 mL demineralizirane vode.

- priprava 0,75 mM HCl

Z merilno pipeto odmerimo 2,5 mL demineralizirane vode. Nato z merilno pipeto odmerimo 15,0 mL HCl in prenesemo v 20 mL bučko ter z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 0,4 mM HCl

Z merilno pipeto odmerimo 6,0 mL demineralizirane vode. Z merilno pipeto odmerimo 8,0 mL 1 mM HCl in prenesemo v 20 mL bučko ter z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 0,2 mM HCl

Z merilno pipeto odmerimo 8,0 mL demineralizirane vode. Z merilno pipeto odmerimo 5,0 mL 1 mM HCl in prenesemo v 25 mL bučko ter z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 0,15 mM KHCO₃

Z merilno pipeto odmerimo 1,5 mL 5 mM KHCO₃ in prenesemo v 50 mL bučko ter z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 0,06 mM KHCO₃

Z merilno pipeto odmerimo 3 mL 5 mM KHCO₃ in prenesemo v 250 mL bučko ter z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 1 M NaOH

Z analitsko tehtnico zatehtamo 4,000 g NaOH in ga prenesemo v 100 mL bučko in z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake.

- priprava 50 mM HEPES, 150 mM HCl, pH 7,5

Z analitsko tehtnico zatehtamo 11,915 g HEPES in 8,766 g NaCl ter ju kvantitativno prenesemo v 1000 mL bučko in raztopimo v nekaj demineralizirane vode. Z magnetnim mešalom mešamo eno uro. Nato v raztopino potopimo elektrodo umerjenega pH metra, ter z 1 M NaOH uravnamo pH na 7,5. Z demineralizirano vodo dopolnimo do oznake. Pufer hranimo v hladilniku in porabimo v petih dneh.

- priprava raztopine tripsina

Tripsin vzamemo iz zamrzovalnika in ga postavimo v ledeno kopel. Na analitsko tehtnico postavimo 2 mL epruveto in s pomočjo tanke spatule zatehtamo ustrezno količino tripsina. Ko končamo, epruveto s tripsinom postavimo v ledeno kopel in odnesemo v zamrzovalnik. Na dan uporabe odtalimo tripsin in dodamo ustrezen volumen pufra in DMSO, ki ju odmerimo z polavtomatsko pipeto 2-20 μ L. Epruveto previdno nekajkrat obrnemo na glavo, da se raztopina premeša. Pustimo jo 15 minut, da se ogreje na sobno temperaturo. Odpremo pokrovček in jo vstavimo v vakumski razplinjevalec, kjer jo razplinjujemo 10 minut na enaki ali malo nižji temperaturi, kot bo potekala izotermna titracija (25 °C).

- priprava raztopine titranta

Vzorci vzamemo iz zamrzovalnika in jih pustimo 50 minut na sobni temperaturi, da se odtalijo. Nato z 0,5-10 μ L polavtomatsko pipeto odvzamemo ustrezno količino vzorca in ga kvantitativno prenesemo v 2 mL epruveto. Nato dodamo ustrezno količino pufra, ki smo ga prenesli v 15 mL centrifugirko. Za začetek uporabimo že uporabljen natavek z 0,5-10 μ L polavtomatske pipete, tako da res speremo ves preostanek vzorca. Preostanek pufra zavržemo. Z 2-20 μ L polavtomatsko pipeto odmerimo ustrezno količino DMSO in epruveto za 20 sekund postavimo na vibracijsko mešalo. Raztopino nato ponovno zamrznemo. Na dan uporabe raztopino vzamemo iz zamrzovalnika in pustimo 50 minut na sobni temperaturi.

- priprava raztopine Contrad-70

Z 10 mL merilno pipeto odvzamemo ustrezen volumen demineralizirane vode (30,0 mL) in jo prenesemo v 50 mL plastično centrifugirko, ter ji dodamo ustrezen volumen čistilnega sredstva Contrad-70 (1,5 mL).

3.2.2. UMERJANJE pH METRA

Z elektrode odstranimo zaščitno kapico, jo speremo s prečiščeno vodo in posušimo. Potopimo jo v pufer s pH 4,00 in ko se meritev umiri, nastavimo vrednost na pH metru na 4,00. Nato elektrodo ponovno speremo s prečiščeno vodo, jo posušimo in potopimo v pufer s pH 7,00 ter nastavimo vrednost na 7,00. Merilna raztopina mora imeti enako temperaturo kot kalibrirni raztopini.

3.2.3. NAČRTOVANJE TITRACIJE

Načrtovanje titracije je odvisno od termodinamskih karakteristik sistema, od teh imata največjo vlogo predvidena afiniteta vezave in toplota reakcije.

Oblika krivulje vezave je odvisna od števila C , ki je definirano kot produkt asociacijske konstante K_a in molarne koncentracije makromolekule. Za pridobitev ustreznega sigmoidnega termograma mora biti število C v območju od 10-100 [53].

Koncentracija liganda mora biti veliko višja od koncentracije makromolekule, saj se morajo proti koncu titracije zasititi vsa vezavna mesta na makromolekuli. Izbrati moramo tako število in volumen injiciranj liganda, da dobimo lepo sigmoidno krivuljo. Ponavadi se izbere večje število injiciranj z volumni od 5 do 10 μL . V kolikor je toplotni signal premajhen, je potrebno izbrati večje volumne injiciranj [39].

Ko se srečamo z ligandi s K_d manjšo od 1 nM naletimo na težavo, saj direktno ne moremo dovolj natančno določiti K_d (vezavna entalpija se kljub temu lahko določi). Zato k makromolekuli najprej dodamo šibkejši zaviralec z višjo K_d in z neugodno entalpijo vezave (pozitiven ΔH). Ko močnejši zaviralec izpodrine šibkejši zaviralec, to povzroči večji signal in eksotermno izotermo [26].

Toplotni signali izhajajo iz štirih glavnih virov: reakcije vezave, razredčitve raztopine liganda, razredčitve raztopine makromolekule, mešanja dveh raztopin. Če sta topili in ostali dodatki identični, se ne bodo pojavili toplotni signali zaradi mešanja. Toploto razredčitve liganda in proteina je potrebno izmeriti v samostojnih titracijah. V prvem primeru titriramo raztopino liganda v pufer in v drugem titriramo pufer v raztopino makromolekule. Ker je koncentracija makromolekule ponavadi v mikromolarnem območju, je njena toplota razredčitve zanemarljiva, medtem ko za toploto razredčitve liganda to ne velja vedno [38].

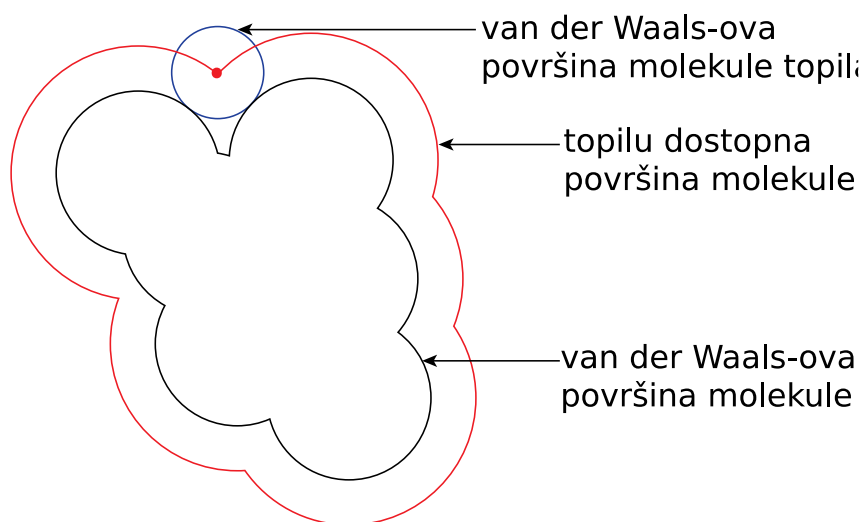
Sprememba entalpije, ki jo izmerimo z ITC-jem, pogosto vsebuje tudi prispevke, ki niso posledica vezave temveč ionizacije pufera. Lahko pride do spremembe protonacije liganda ali makromolekule in do izmenjave protonov s topilom. Temu učinku se izognemo tako, da izvedemo več meritev pri različnih pH-jih in v puffrih z različnimi ionizacijskimi entalpijami [54].

V kolikor izvedemo titracijo pri dveh različnih temperaturah, lahko določimo spremembo toplotne kapacitete ob vezavi (ΔC_p). ΔC_p povezuje termodinamiko vezave s strukturo proteina. Med drugim je ΔC_p odvisna predvsem od sprememb molekulske površine, ki je dostopna topilu.

Enačba 12. Sprememba toplotne kapacitete

$$\Delta C_p = \frac{\Delta H_{T_1} - \Delta H_{T_2}}{T_2 - T_1}$$

Dostopna molekulska površina (»*Accessible surface area*«) je molekulska površina biomolekule, ki je dostopna topilu. Prvič sta jo leta 1971 definirala Lee in Richards. Mejo dostopne molekulske površine označuje center sferične/okrogle sonde, ki se premika po van der Waals-ovi površini biomolekule. Radij sferične sonde je enak radiju van der Waals-ove površine molekule topila [55].

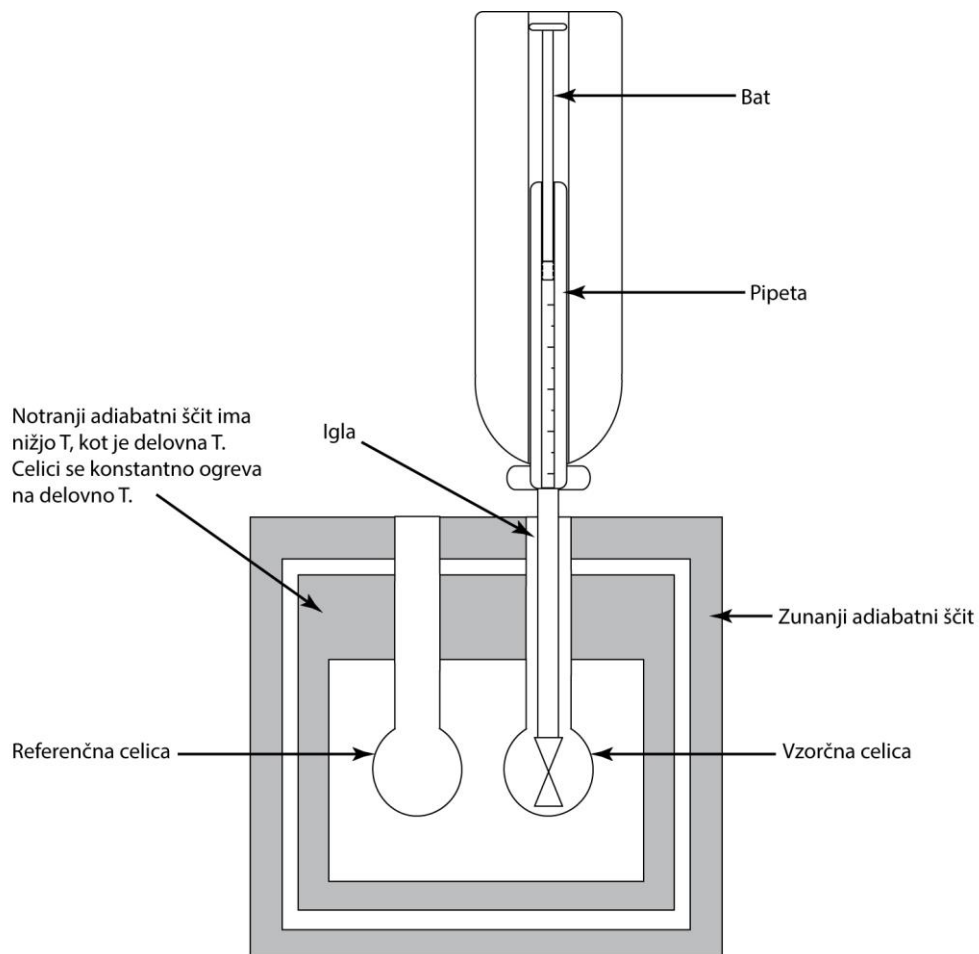


Slika 6: Topilu dostopna molekulska površina (povzeto po [56]).

3.2.4. UPORABA ITC

Najprej v programu ITC Run nastavimo naslednje spremenljivke:

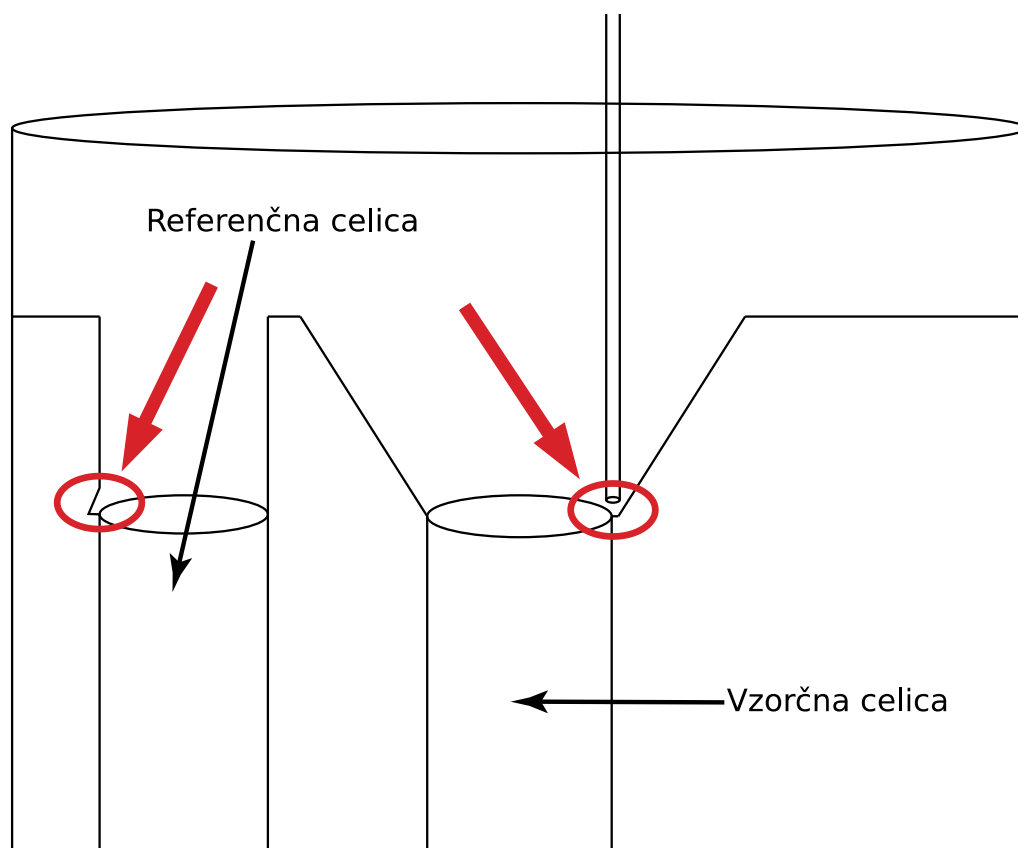
- I. koncentracijo raztopine v igli
- II. koncentracijo raztopine v celici
- III. volumen injiciranja
- IV. število injiciranj
- V. časovni razmik med injiciranj
- VI. temperaturo titracije
- VII. hitrost mešanja
- VIII. čas umerjanja



Slika 7: Shema ITC.

S pomočjo dolge injekcije, ki je priložena kalorimetru, zajamemo vsaj 2 mL pufru in injekcijo vstavimo v referenčno celico približno 2 mm od dna celice. Celico napolnimo s pufrom do roba lijaka in nato odvečni pufer zajamemo nazaj v injekcijo. To ponovimo najmanj trikrat. Na koncu moramo odstraniti ves pufer iz celice. Referenčno raztopino zamenjamo enkrat tedensko.

Epruveti z odtaljenim titrantom in raztopino tripsina postavimo z odprtimi pokrovčki v vakumski razplinjevalec za 10 minut. V epruveti dodamo tudi magnetna mešala in še pred vklopom vakuma vklopimo mešanje, ki ga po 9 minutah izklopimo. Temperatura v vakumskem razplinjevalcu mora biti enaka ali malo nižja kot temperatura, pri kateri bo potekala izotermna titracija v kalorimetru. Z dolgo injekcijo zajamemo raztopino tripsina in jo vstavimo v sredinsko, vzorčno celico približno 2 mm od dna celice. Celico počasi napolnimo z raztopino tripsina in pri tem pazimo, da ne injiciramo zraka. Dvakrat na hitro injiciramo malo raztopine, da izženemo morebitne mehurčke zraka, ki se držijo stene celice. Nato z injekcijo na rahlo pomešamo, jo naslonimo na rob ozkega dela lijaka (kot kažeta rdeči puščici na sliki 9) in zajamemo višek raztopine.



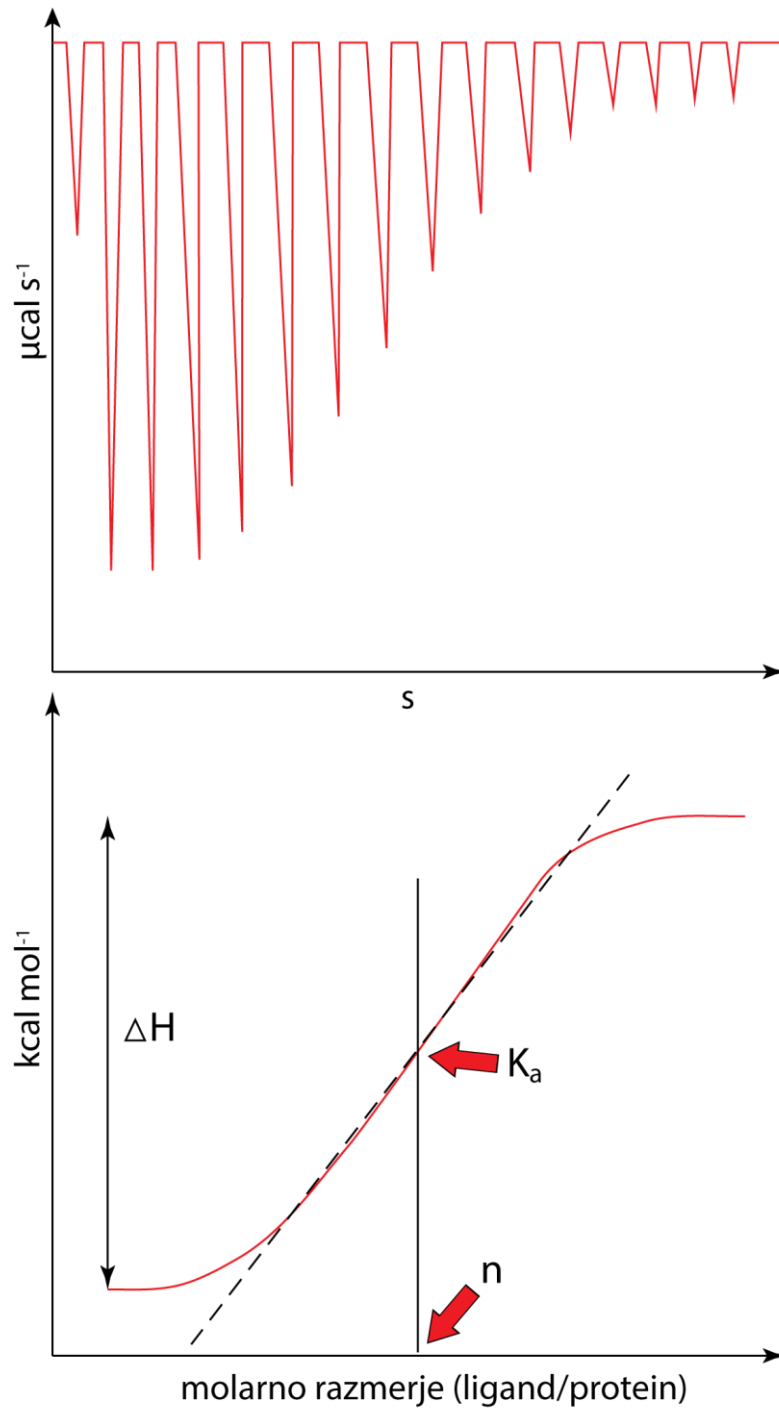
Slika 8: Notranji del ITC.

Izberemo ustrezno titracijsko pipeto in jo dobro speremo s pufrom ter jo s potiskanjem zraka skozi iglo temeljito posušimo. Če bi imeli na voljo dovolj titranta, bi lahko pipeto sprali s titrantom. Nato s pipeto zajamemo titrant in pri tem pazimo, da se v pipeti ne pojavijo mehurčki. V kolikor opazimo mehurček, ga poskusimo z rahlimi tresljaji odlepiti s stene, sicer ponovimo polnjenje pipete. Napolnjeno pipeto navijemo v bireto in ko jo zavijemo do konca, se mora na koncu injekcije narediti kapljica, ki jo s strani pazljivo zberemo. Če se kapljica ne pojavi, ponovimo polnjenje injekcije. Nato bireto navpično vstavimo v celico in potisnemo bajonet navzdol in v levo, da se zaskoči. Pazimo, da se z iglo ne zadanemo v rob lijaka, saj bi s tem povzročili izhod titranta v raztopino tripsina. Tekom celotnega procesa moramo izjemno paziti, da ne skrivimo igle na pipeti, saj bi že majhna ukrivljenost igle motila bazno linijo.

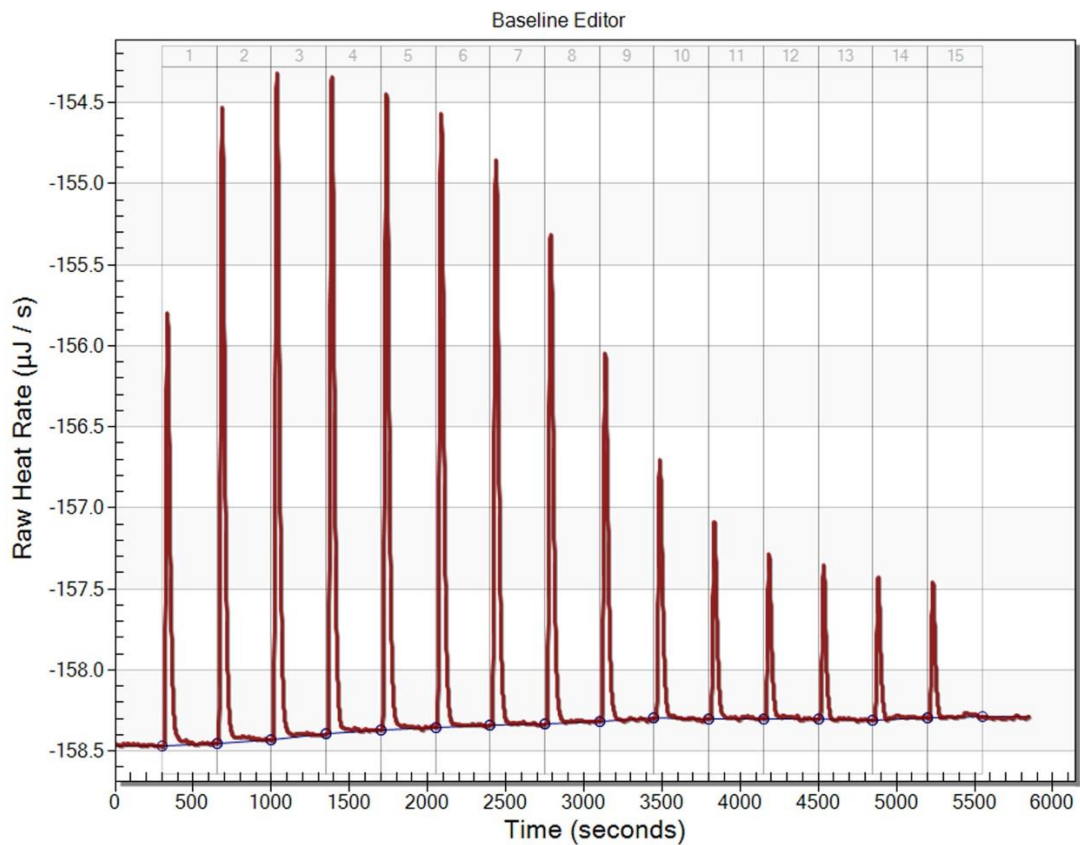
V programu ITC Run zaženemo titracijo. Med trajanjem titracije se čim manj gibljemo po prostoru in ne puščamo odprtih vrat, saj tresljaji in spremembe temperature vplivajo na meritve.

Po končani titraciji potisnemo bajonet navzdol in v desno, ter ga previdno dvignemo. Z dolgo injekcijo odzhamemo raztopino iz vzorčne celice. Zatem vzorčno celico napolnimo s 5% raztopino čistilnega sredstva Contrad-70 in pustimo pri sobni temperaturi 10 minut. Z dolgo injekcijo odstranimo čistilno sredstvo in namestimo čistilno napravo, ki je preko erlenmajerice in vakumske črpalke razplinjevalca priključena na podtlak. Dovodno cev vstavimo v steklenico z demineralizirano vodo in skozi celico prečrpamo 250-500 mL vode. Nato odstranimo čistilno napravo in z bajonetom zapremo celico.

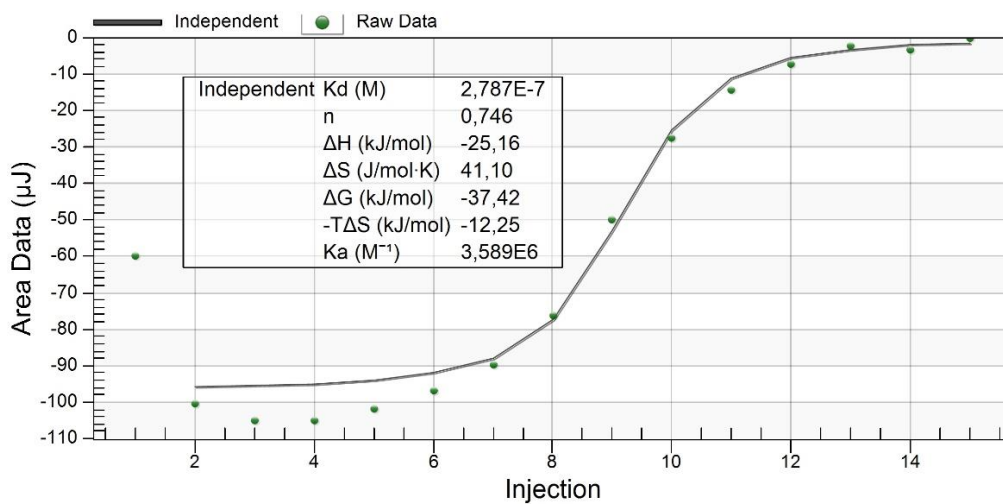
Po koncu programska oprema integrira posamezne toplotne signale in jih poda v grafu kjer je na y osi sprememba energije na mol in x osi molarno razmerje med ligandom in proteinom. Izbere se pravilen model vezave ter prilagodi izotermo, iz katere dobimo podatke o dH , K in n . Iz teh podatkov program nato izračuna dG in dS .



Slika 9: Primer ITC termograma.



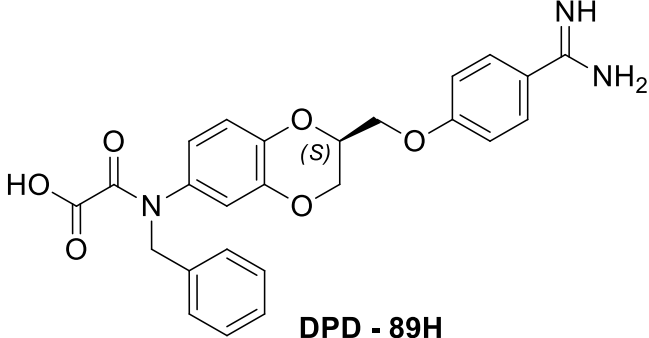
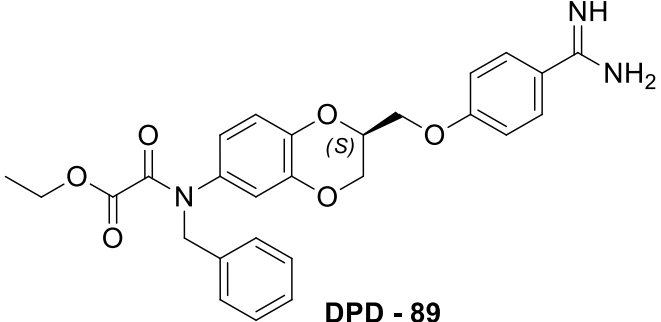
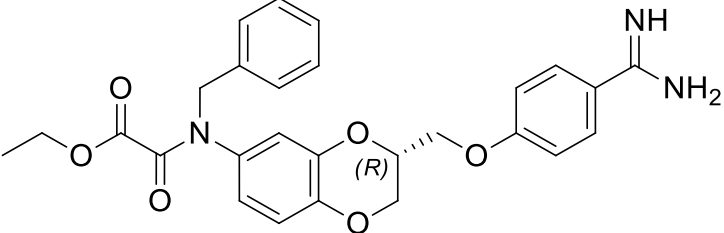
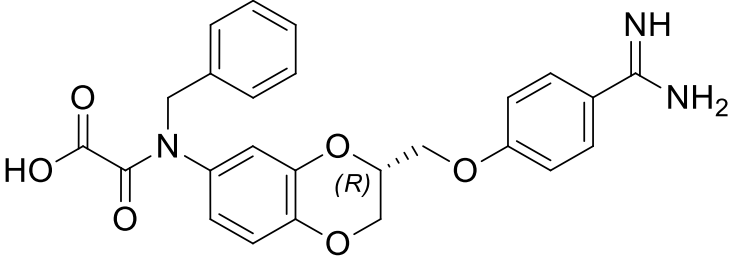
Slika 10: Primer ITC termograma.

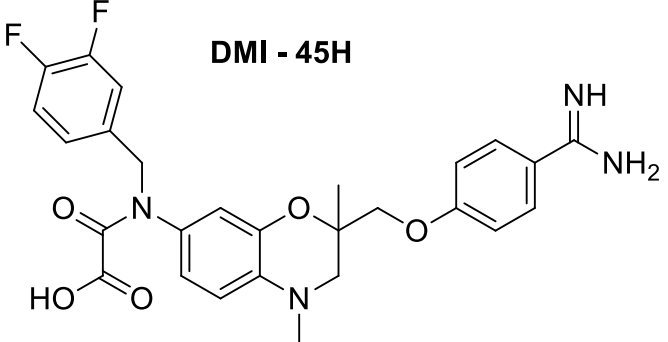
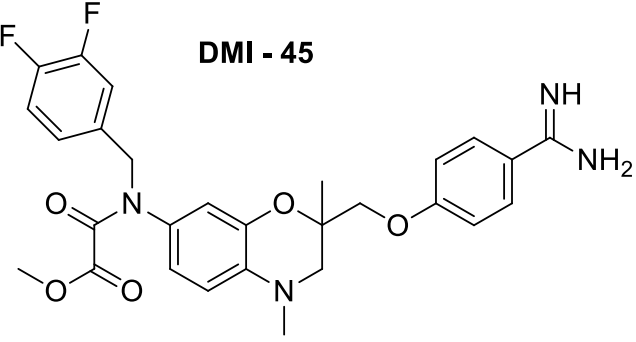
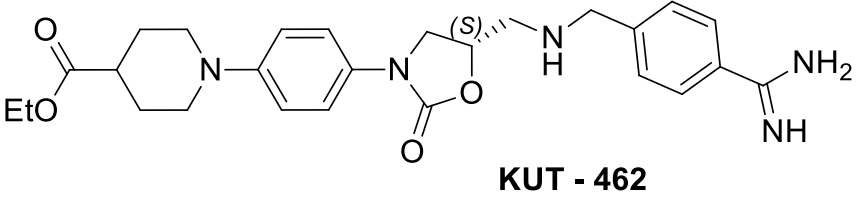
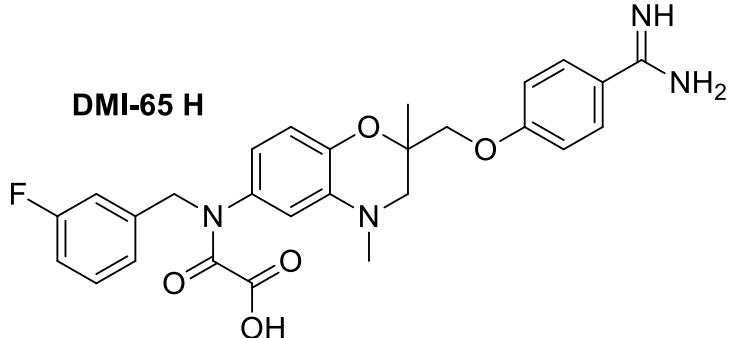
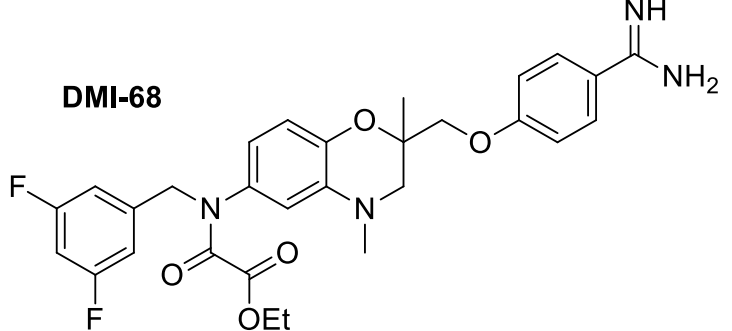


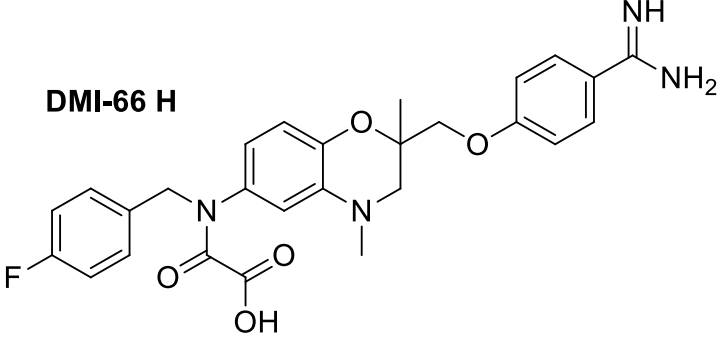
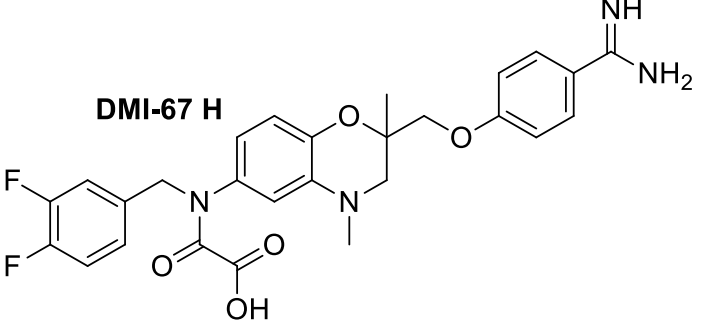
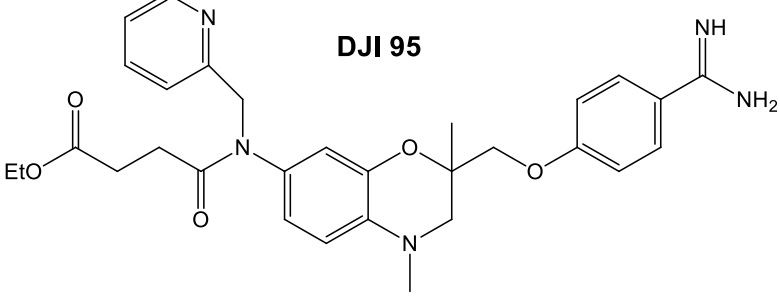
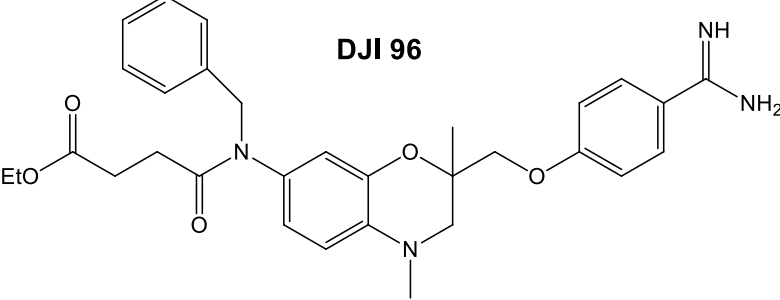
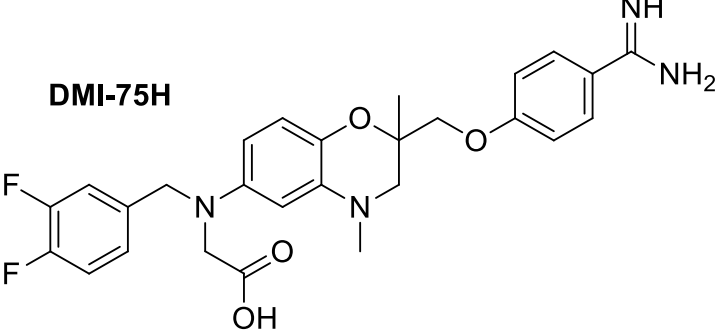
Slika 11: Ujemajoča sigmoidna krivulja.

3.3. STRUKTURNE FORMULE TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV

Preglednica II. Strukturne formule izbranih zaviralcev.

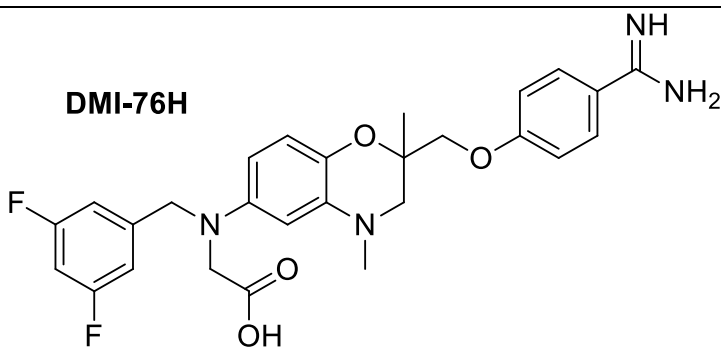
Ime zaviralca	Strukturna formula zaviralca
<ul style="list-style-type: none"> DPD 89H 	 <p style="text-align: center;">DPD - 89H</p>
<ul style="list-style-type: none"> DPD 89 	 <p style="text-align: center;">DPD - 89</p>
<ul style="list-style-type: none"> DPD 112 	 <p style="text-align: center;">DPD - 112</p>
<ul style="list-style-type: none"> DPD 112H 	 <p style="text-align: center;">DPD - 112H</p>

<ul style="list-style-type: none"> • DMI 45H 	<p style="text-align: center;">DMI - 45H</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DMI 45 	<p style="text-align: center;">DMI - 45</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • KUT 462 	<p style="text-align: center;">KUT - 462</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DMI 65H 	<p style="text-align: center;">DMI-65 H</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DMI 68H 	<p style="text-align: center;">DMI-68</p> 

<ul style="list-style-type: none"> • DMI 66H 	<p style="text-align: center;">DMI-66 H</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DMI 67H 	<p style="text-align: center;">DMI-67 H</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DJI 95 	<p style="text-align: center;">DJI 95</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DJI 96 	<p style="text-align: center;">DJI 96</p> 
<ul style="list-style-type: none"> • DMI 75H 	<p style="text-align: center;">DMI-75H</p> 

- DMI 76H

DMI-76H



4. REZULTATI

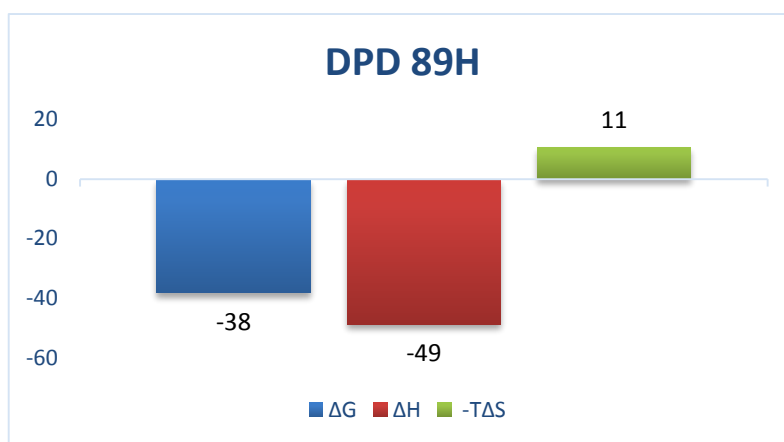
4.1. REZULTATI MERITEV, OPRAVLJENIH Z ITC

Preglednica III. Rezultati meritev, pridobljenih z ITC. V kolikor ni določeno drugače, je koncentracija DMSO pri tripsinskih inhibitorjih 2,5% in pH 7,5. Legenda: K_d – konstanta disociacije; n – število vezavnih mest; ΔH – sprememba entalpije, ΔG – sprememba Gibbsove proste energije, ΔS – sprememba entropije.

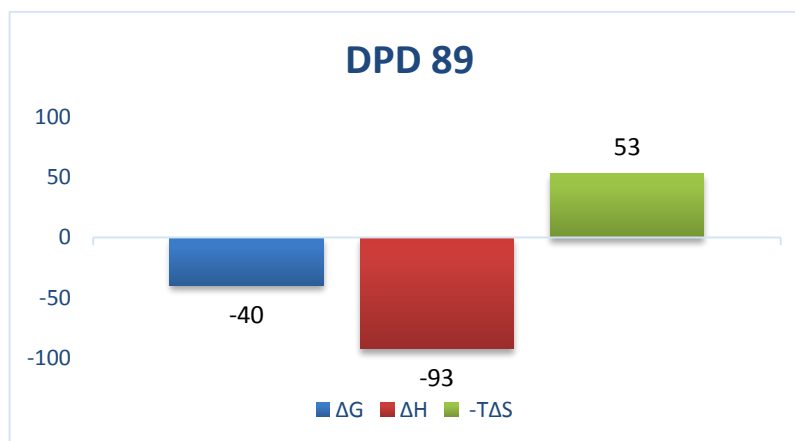
Zaviralec		K_d (μM)	n	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/molK)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)	K_a (M^{-1})	število meritev
Titracija									
KHCO ₃ s HCl	povprečje	0,68±0,20	1,1±0,1	-8,6±0,3	89±3	-35±1	-27±1	1,6±0,4×10 ⁶	10
DPD 89	povprečje	0,23±0,08	0,75±0,66	-49±2	-3,6±7,0	-38±1	11±21	5,0±2,1×10 ⁶	8
DPD 89H	povprečje	0,12±0,02	0,27±0,06	-93±5	-180±20	-40±0,5	53±4	8,9±1,4×10 ⁶	6
DPD 112	povprečje	0,84±0,04	0,39±0,08	-49±4	-48±13	-35±0,1	14±4	1,2±0,06×10 ⁶	5
DPD 112H	povprečje	1,4±0,03	0,80±0,13	-29±3	15±8	-33±0,1	-4,6±2,5	7,3±0,2×10 ⁵	2
DMI 45H	meritev	2,3	0,53	-34	-52	-32	16	4,4×10 ⁵	1
DMI 45	povprečje	1,3±0,7	0,36±0,07	-30±1	15±6,2	-34±1	-4,5±1,9	1,0±0,5×10 ⁶	4
KUT 462	povprečje	1,8±0,3	0,40±0,1	-38±2	-16±6	-33±0,5	4,7±1,8	5,9±1,2×10 ⁵	4
DMI 65H	povprečje	2,6±0,2	0,60±0,05	-18±1	47±4	-32±0,2	-14±1	3,9±0,3×10 ⁵	2
DMI 68H	meritev	5,0	0,49	-16	48	-30	-14	2,0×10 ⁵	1

DMI 66H	povprečje	1,5±0,4	0,73±0,42	-15±0,4	60±1	-33±0,6	-18±0,3	7,0±1,8×10 ⁵	2
DMI 67H	povprečje	2,8±0,03	0,68±0,04	-20±0,3	39±1	-32±0,03	-12±0,3	3,6±0,04×10 ⁵	2
DMI 67H (5%DMSO)	meritev	2,0	0,73	-15	58	-33	-17	5,0×10 ⁵	1
DJI 95	povprečje	1,2±0,1	0,64±0,1	-18±2	54±8	-34±0,3	-16±3	8,1±0,8×10 ⁵	3
DJI 95 (pH 7,00)	povprečje	1,9±0,5	0,67±0,002	-18±1	49±6	-33±1	-14±2	5,5±1,4×10 ⁵	2
DJI 96 (brez DMSO)	povprečje	2,7±0,1	0,59±0,06	-15±1	56±2	-32±0,1	-17±1	3,7±0,1×10 ⁵	2
DJI 96	povprečje	1,4±0,1	0,64±0,02	-16±1	59±2	-33±0,1	-18±1	7,2±0,3×10 ⁵	2
DMI 75H	meritev	0,54	0,47	-15	50	-30	-15	1,9×10 ⁵	1
DMI 76H	povprečje	2,2±0,3	0,54±0,04	-20±0,2	42±1	-32±0,3	-13±0,2	4,6±0,6×10 ⁵	2

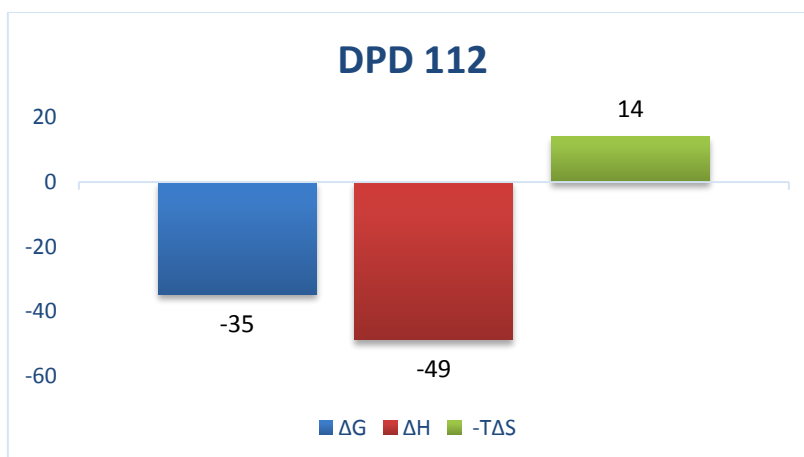
4.2. ENTROPIJSKI IN ENTALPIJSKI PRISPEVKI POSAMEZNIH TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV



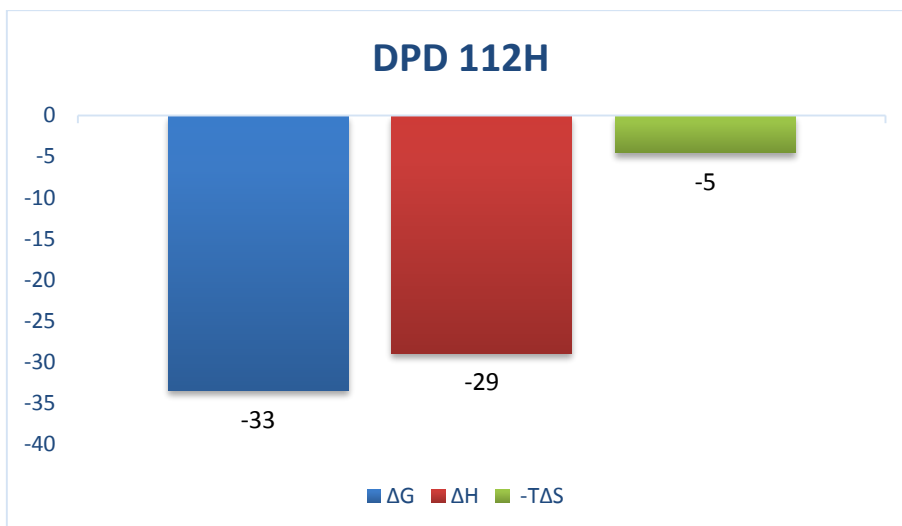
Slika 12: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DPD 89H.



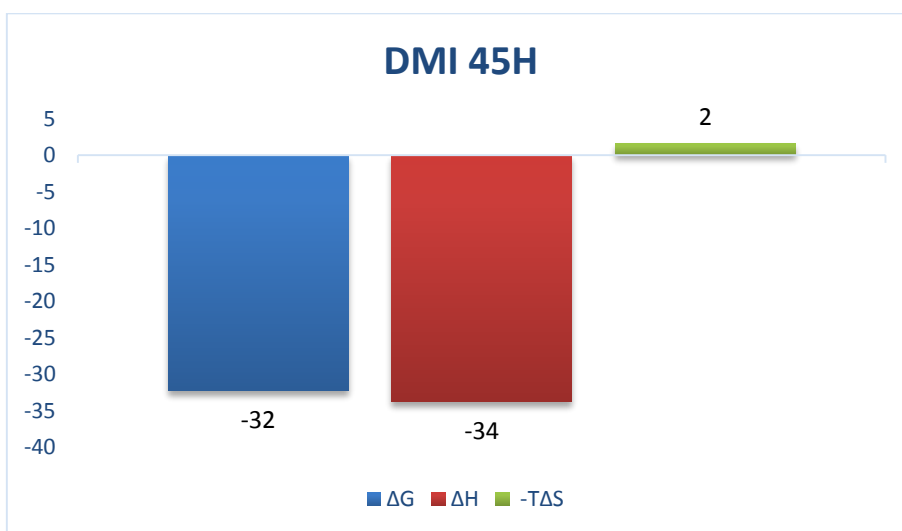
Slika 13: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DPD 89.



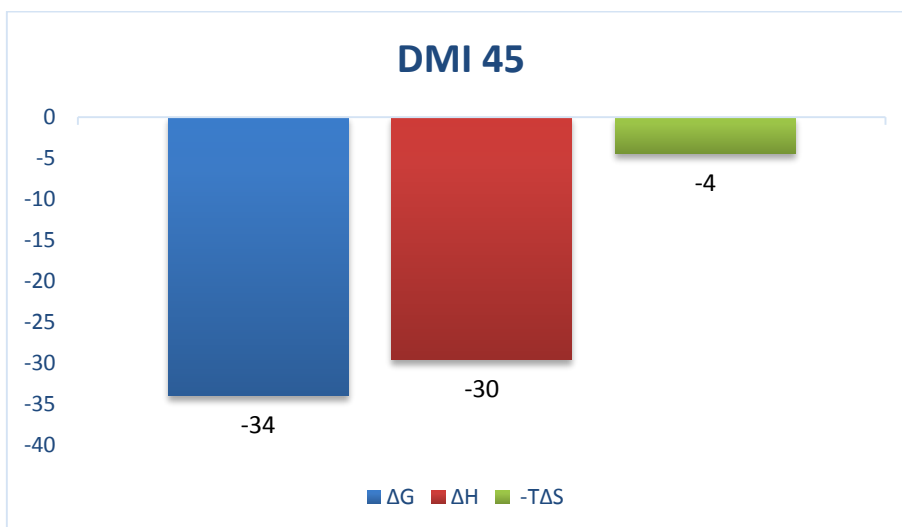
Slika 14: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DPD 112.



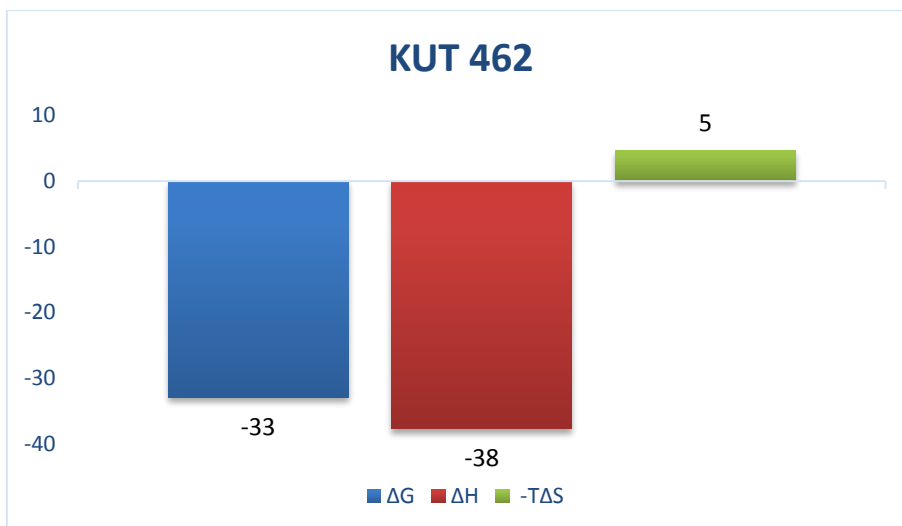
Slika 15: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DPD 112H.



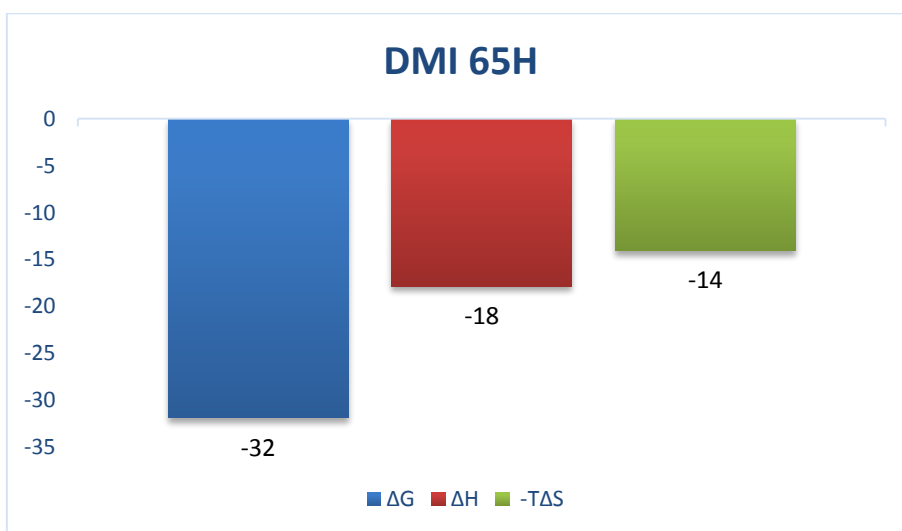
Slika 16: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 45H.



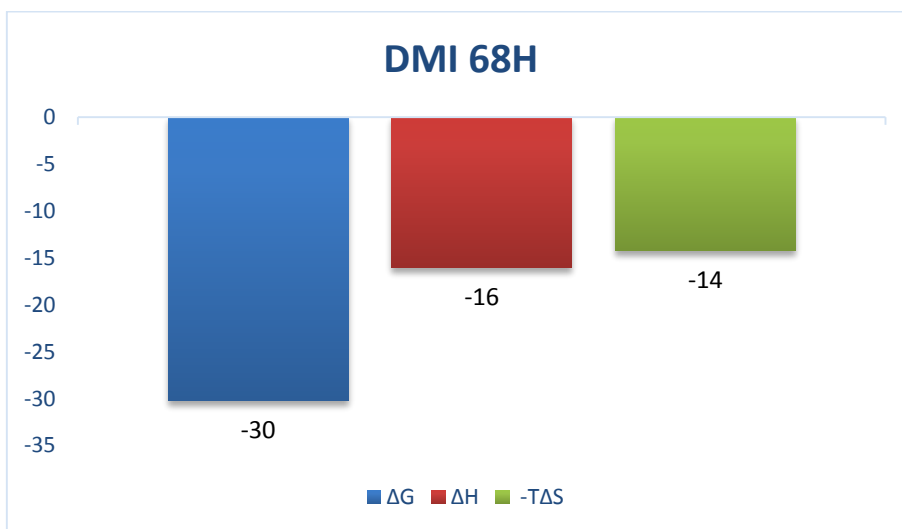
Slika 17: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 45.



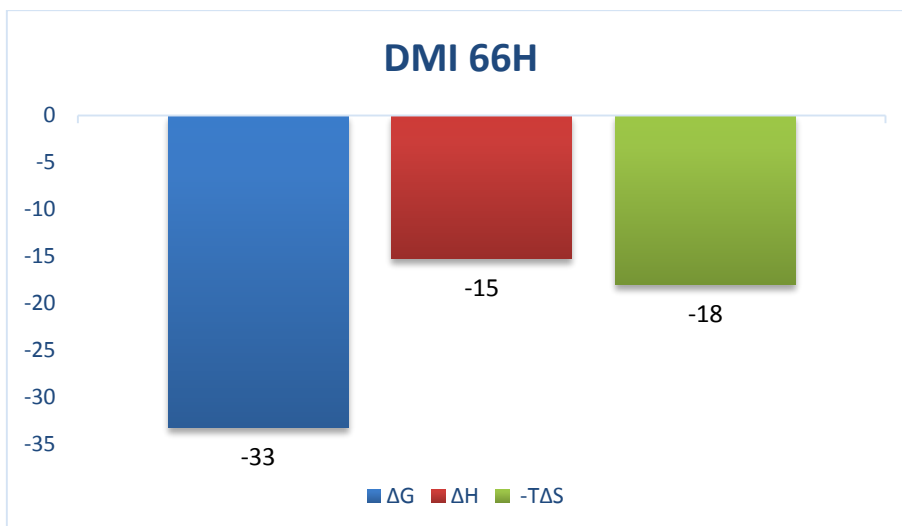
Slika 18: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zavriralca KUT 462.



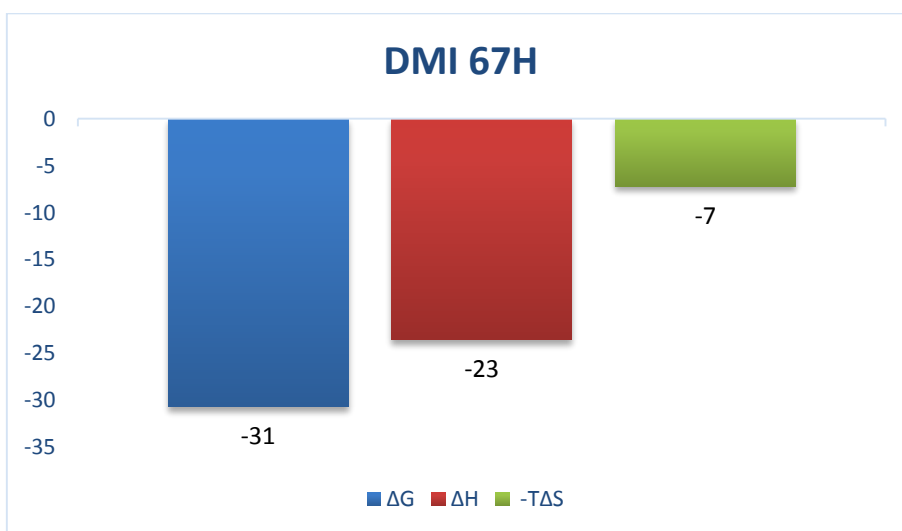
Slika 19: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zavriralca DMI 65H.



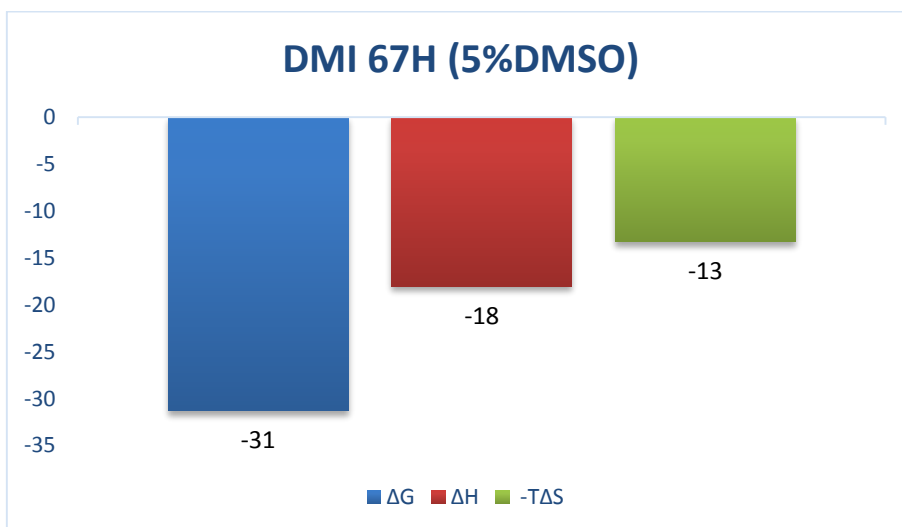
Slika 20: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zavriralca DMI 68H.



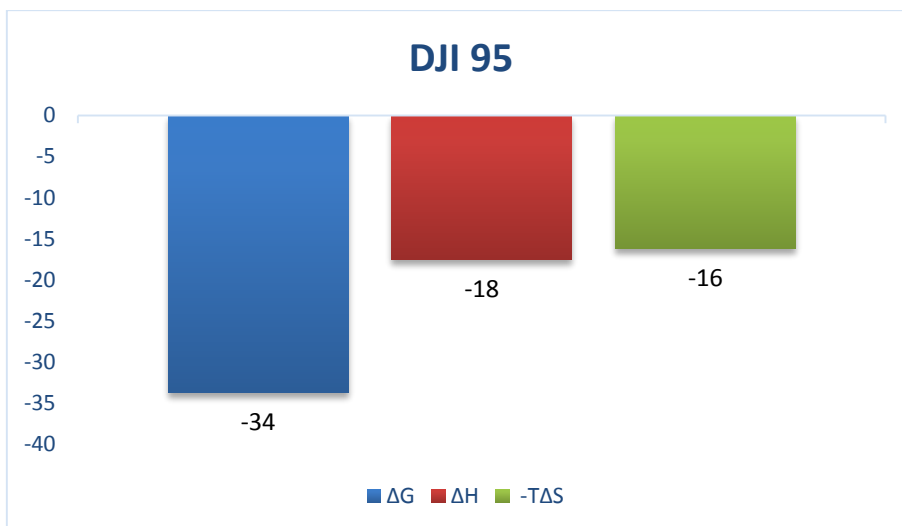
Slika 21: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 66H.



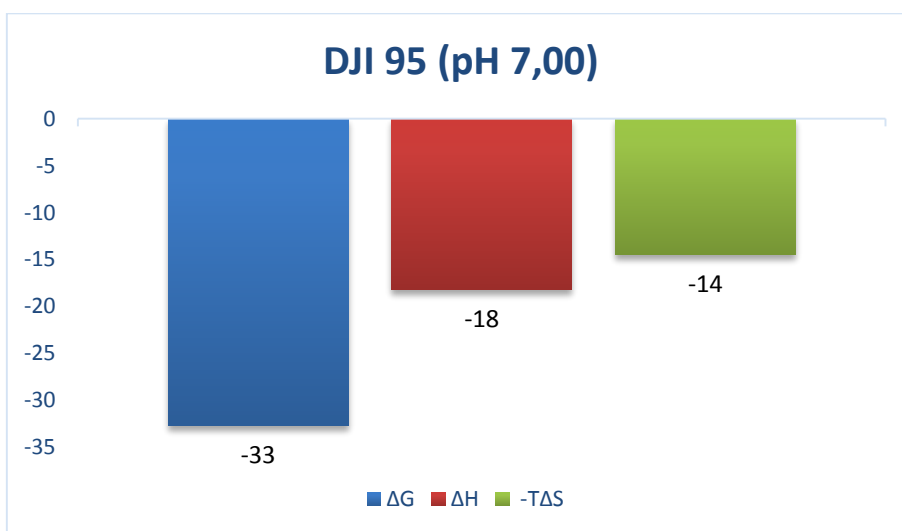
Slika 22: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 67H.



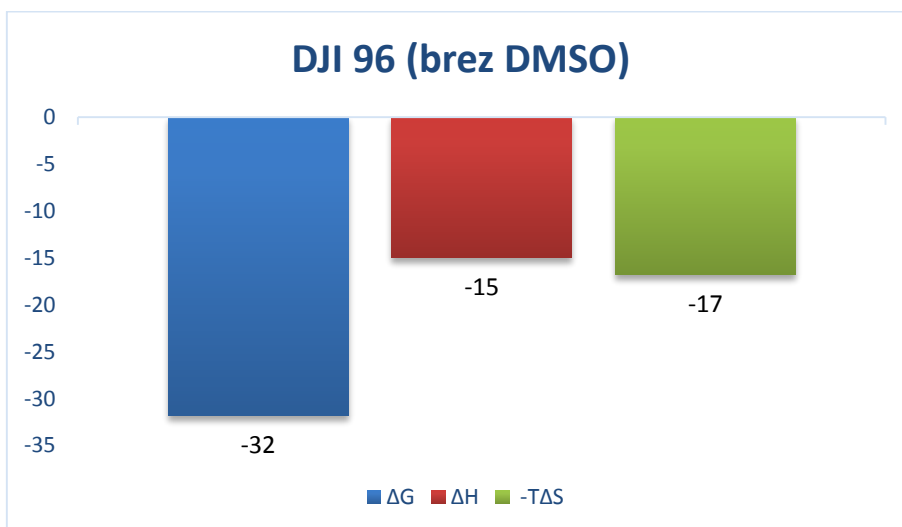
Slika 23: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 67H (5% DMSO).



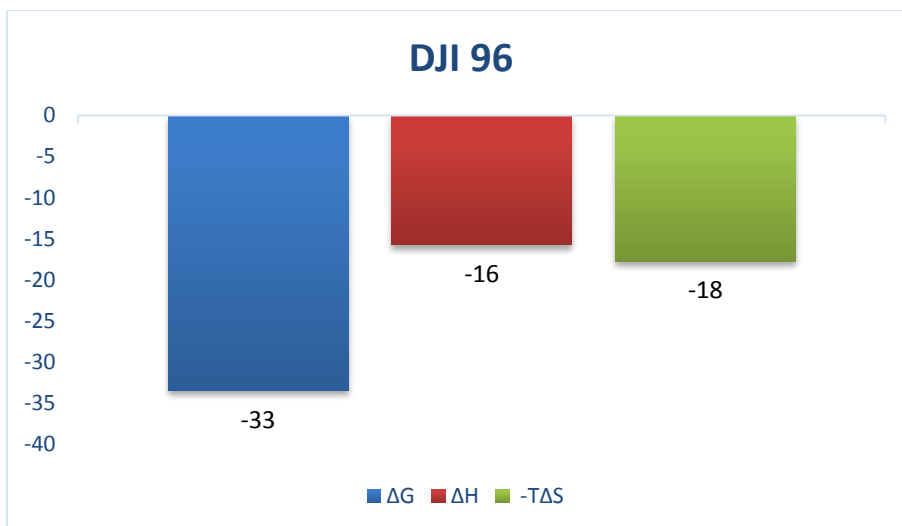
Slika 24: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DJI 95.



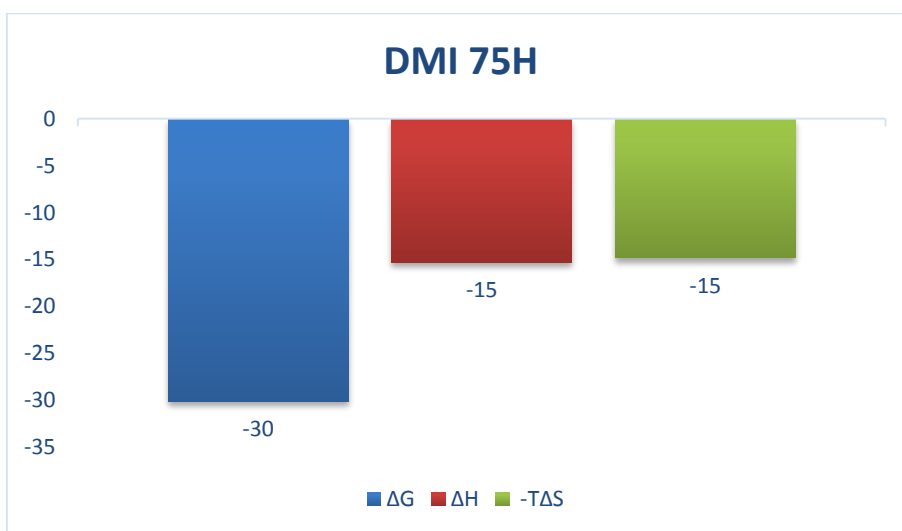
Slika 25: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DJI 95 (pH 7,00).



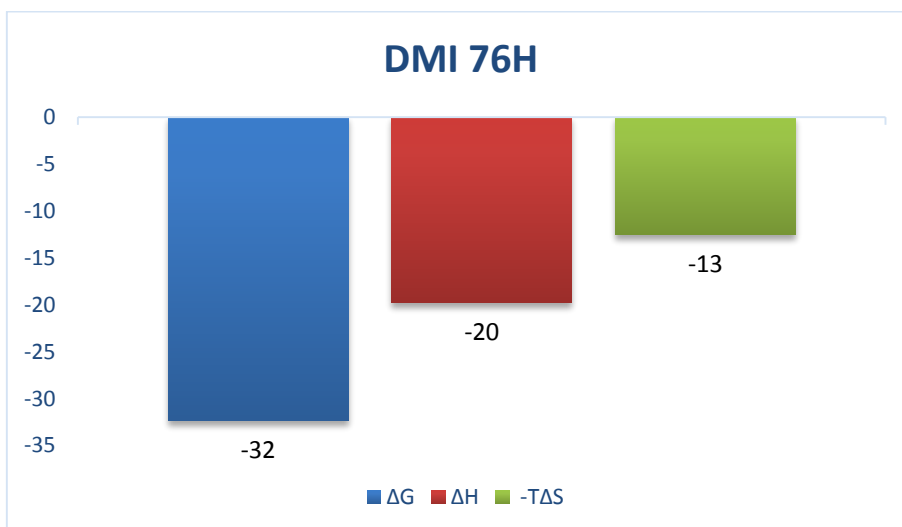
Slika 26: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DJI 96 (brez DMSO).



Slika 27: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DJI 96.



Slika 28: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 75H.



Slika 29: Entropijski in entalpijski prispevek (kJ/mol) zaviralca DMI 76H.

Preglednica IV: Primerjava izmerjenih K_{di} z referenčnimi K_{dr} .

Zaviralec	K_{di} (μM) izmerjen	Št. meritev	K_{dr} (μM) referenčni	K_{di}/K_{dr}
DMI 45	$1,3 \pm 0,7$	4	$0,65 \pm 0,04$ [57]	200%
DMI 45H	2,3	1	$1,3 \pm 0,1$ [57]	171%
DMI 65H	$2,6 \pm 0,2$	2	$0,81 \pm 0,23$ [57]	320%
DMI 66H	$1,5 \pm 0,4$	2	$1,1 \pm 0,2$ [57]	143%
DMI 67H	$4,2 \pm 0,05$	2	$5,3 \pm 0,7$ [57]	79%
DMI 68H	5,0	1	$5,3 \pm 0,9$ [57]	95%
DPD 89H	$0,23 \pm 0,08$	8	$0,46 \pm 0,09$ [58]	50%
DPD 89	$0,12 \pm 0,02$	6	$0,28 \pm 0,04$ [58]	41%
DMI 75H	0,54	1	$0,54 \pm 0,04$ [57]	96%
DMI 76H	$2,2 \pm 0,3$	2	$0,72 \pm 0,03$ [57]	306%
DPD 112	$0,84 \pm 0,04$	5	$0,89 \pm 0,10$ [58]	93%
DPD 112H	$1,4 \pm 0,03$	2	$1,4 \pm 0,03$ [58]	100%
KUT 462	$1,8 \pm 0,3$	4	$2,2 \pm 0,3$ [59]	81%

5. DISKUSIJA

5.1. TESTNE TITRACIJE

Da bi preverili postopek meritve z izotermnim titracijskim kalorimetrom, smo najprej izvedli 10 testnih titracij KHCO_3 s HCl pri različnih koncentracijah. Naš cilj je bil izmeriti ΔH , ki je čim bližje podatkom iz literature, in to je za prej omenjeno titracijo: $-9,15 \text{ kJ/mol}$ [60][61]. Nekatero titracije so se približale želeni vrednosti, vendar je povprečje desetih meritev znašalo $-8,63 \text{ kJ/mol}$, s čimer smo lahko le delno zadovoljni.

Prav pri vseh desetih meritvah smo izmerili ΔH nižjo od $-9,15 \text{ kJ/mol}$. Glavni vzrok za ta pojav je bilo verjetno raztapljanje CO_2 v raztopini KHCO_3 , kar povzroči znižanje koncentracije KHCO_3 in posledično nižje ΔH pri nevtralizaciji s HCl .

Vpliv CO_2 na koncentracijo KHCO_3 bi zmanjšali tako, da bi za vsako nevtralizacijsko titracijo pripravili svežo raztopino KHCO_3 v večji koncentraciji, ki bi jo nato ustrezno razredčili.

5.2. VEZAVA TRIPSINSKIH ZAVIRALCEV

Pri spojinah DMI 45, DMI 45H, DPD 89, DPD 89H, DPD 112, DPD 112H in KUT 462, smo izmerili ugoden entalpijski prispevek in neugoden entropijski prispevek ob vezavi. Tako lahko rečemo, da je vezava naštetih tripsinskih zaviralcev entalpijsko vodena.

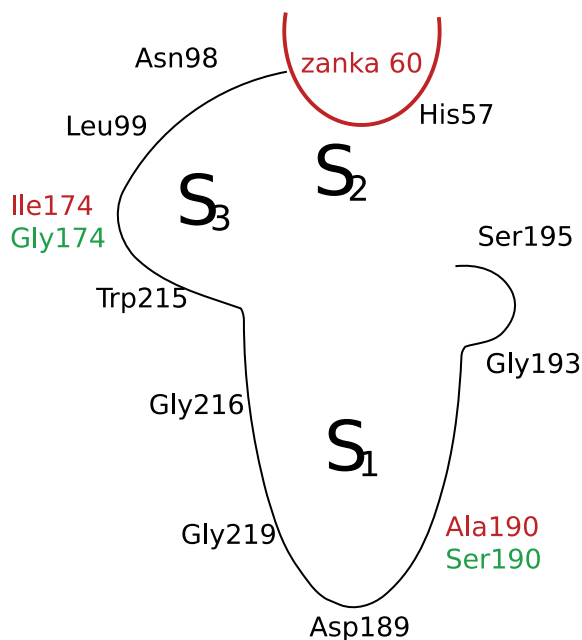
Pri spojinah DJI 95, DJI 95H, DMI 65H, DMI 66H, DMI 67H, DMI 68H, DMI 75H in DMI 76H smo izmerili ugoden entalpijski in ugoden entropijski prispevek ob vezavi, tako da sta bila oba prispevka bolj ali manj uravnotežena.

Na splošno bi lahko dejali, da ob vezavi prve skupine zaviralcev na tripsin pride do nastanka H-vezi in neugodne konformacijske spremembe. Pri drugi skupini skupini pa poleg nastanka H-vezi, pride tudi do hidrofobnih interakcij.

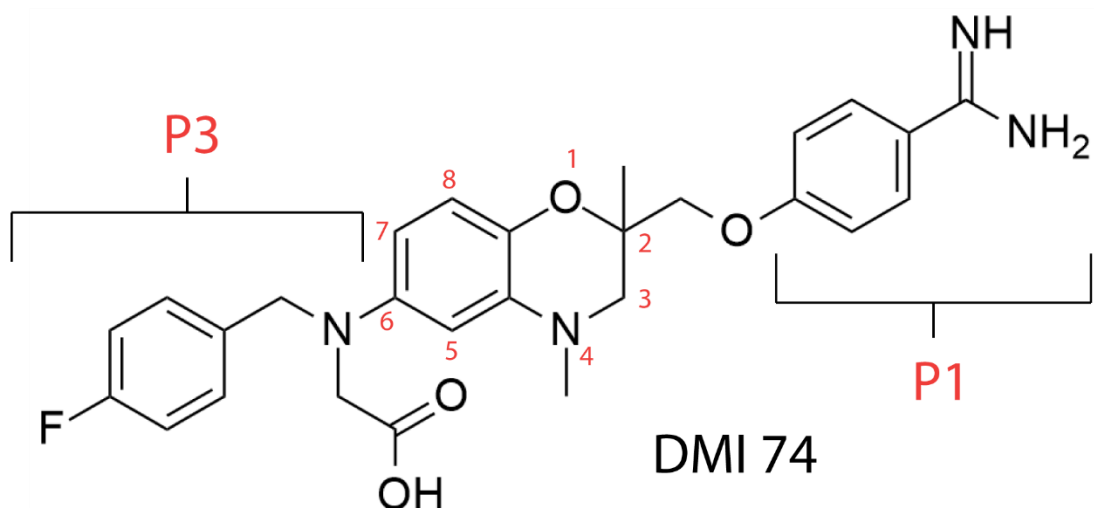
Dejstvo, da smo vsem spojinam izmerili negativno spremembo entalpije ob vezavi, je bilo pričakovano, saj vse spojine vsebujejo benzamidinsko skupino, ki z Asp 189 tvori ionske interakcije, poleg tega pa preko molekul vode v S_1 področju tripsina tvori H-vezi [58][59][62]. Poleg tega lahko benzamidinska skupina tvori H vezi še z Gly 219, pri spojinah, ki vsebujejo 1,4-benzoksazinsko ogrodje, pa se lahko med benzoksazinskim

kiskom in Gly 216 tvori H vez [57]. Enako velja tudi za spojine z 1,4-benzodioksinskim ogrodjem. Vse te H-vezi prispevajo k ugodni spremembi entalpije ob vezavi.

Večina spojin, ki so imele uravnotežen entalpijski in entropijski prispevek, so substituirane na mestu 6 1,4-benzoksazinskega ogrodja. Spojine, ki so substituirane na mestu 7 1,4-benzoksazinskega ali 1,4-benzodioksinskega ogrodja, so imele pretežno ugoden entalpijski in neugoden entropijski prispevek k vezavi, kar kaže na to, da se pri spojinah, ki so substituirane na mestu 7 1,4-benzoksazinskega ogrodja, P3 fenilni obroč lažje vstavi v S_3 vezavno mesto tripsina, kjer tvori π - π aromatske interakcije s Trp 215 in izboljša entalpijo vezave. Do podobnega pojava pride tudi v aktivnem mestu trombina, kot so ugotovili *Ilič s sodelavci* [57][63].



Slika 30: Primerjava aktivnega mesta tripsina in trombina. Rdeče in črno besedilo prikazujeta aktivno mesto trombina ter zeleno in črno aktivno mesto tripsina. (povzeto po [51]).



Slika 31: P1 in P3 del na primeru spojine DMI 74.

Izjema sta spojini DJI 95 in DJI 96, katerima smo kljub dejstvu, da imata P3 substituent vezan na mesto 7 1,4-benzoksazinskega ogrodja, določili ugoden entalpijski in entropijski prispevek ob vezavi. Entropijo vezave verjetno izboljša γ -keto esterski substituent na terciarnem aminu v P3 delu zaviralca, ki ob vezavi gleda izven površine aktivnega mesta tripsina in poveča fleksibilnost zaviralca [58].

Opazili smo tudi majhno razliko med samima spojinama DJI 95 in DJI 96. Spojina DJI 95 ima malce bolj negativno spremembo entalpije ob vezavi (-18 kJ/mol proti -16 kJ/mol). Edina strukturna razlika med omenjenima spojinama je, da ima DJI 95 na P3 delu na terciarni amin vezan piridinski obroč, DJI 96 pa fenilni. Piridin ima konjugiran sistem 6 π elektronov, ki so delokalizirani po obroču. Vendar zaradi elektronegativnega dušika, ki svojega prostega elektronskega para ne prispeva v aromatski sistem obroča, elektronska gostota ni enakomerno razporejena po obroču in ima molekula dipolni moment. Elektronska gostota je največja v okolici dušika, v oddaljenem delu piridina nasproti dušika pa najnižja. Z delom z nizko elektronsko gostoto bi piridin lahko tvoril močnejše π - π interakcije s π elektronskim oblakom Trp 215 kot pa fenil. Več raziskav je potrdilo, da se arilne skupine pravokotno (*»edge on«*) preko π - π interakcij vežejo na ploskev Trp 215 [64].

Spojini DPD 89 in DPD 89H imata P3 skupino vezano na mesto 6 1,4-benzodioksinskega ogrodja, a se jima entropija ob vezavi zmanjša, še posebej spojini DPD 89. Razlogov je več. Spojine DPD imajo namesto 1,4-benzoksazinskega, 1,4-benzodioksinsko ogrodje, kar

pomeni, da lahko poleg kisika na mestu 1, H-vezi tvori tudi kisik na mestu 4, recimo z Gly 193 ali Ser 195. Poleg tega fenilni obroči na P3 delu DPD spojin, za razliko od DMI spojin, ne vsebujejo fluoridnih atomov, ki izboljšajo aromatske in hidrofobne interakcije v S₃ žepu tripsina [57]. *Brandt s sodelavci* so ugotovili, da se z večanjem alifatskega obroča na P3 delu tripsinskih zaviralcev povečuje ugoden entropijski prispevek, entalpijski prispevek pa se zmanjšuje [65]. Večji terminalni obroč lažje izpodrine molekule strukturne vode v S₃ žepu tripsina in tako poveča entropijo sistema [63].

Spojina DPD 89H ima na terciarni P3 dušik pripeto α -ketokislino, DPD 89 pa α -keto etilni ester. DPD 89, spojina z etilnim estrom, ima bolj ugoden entalpijski prispevek in manj ugoden entropijski prispevek kot spojina DPD 89H s karboksilatom. Razlog je verjetno v desolvatacijski entropiji karboksilata (DPD 89H). Karboksilat lahko v vodnem mediju tvori več H-vezi. Ob vezavi se število H-vezi zaradi prostorske omejitve ali prisotnosti drugih nabitih skupin zmanjša, kar poslabša entalpijo in izboljša entropijo vezave. Podoben pojav smo opazili tudi pri spojinah DPD 112 in DPD 112H.

Spojinama DPD 89 in DPD 89H smo določili opazno nižji konstanti inhibicije kot pa spojinama DPD 112 in DPD 112H. Ker sta spojinama DPD 89 in DPD 89H (*S*)-izomera s P3 skupino vezano na mesto 6 1,4-benzodioksinskega obroča, spojinama DPD 112 in DPD 112H pa (*R*)-izomera s P3 skupino na mestu 7, so omenjeni rezultati pričakovani, saj so že *Ilič s sodelavci* ugotovili, da so DPD spojine, ki so (*S*)-izomeri, boljši zaviralci trombina [58].

S primerjavo spojin DMI 65H, DMI 66H, DMI 67H in DMI 68H, ki se med seboj razlikujejo le v načinu substitucije P3 fenilnega obroča s fluoridnimi atomi, smo opazili, da so 3 in 4-fluoro substituirane spojine močnejši zaviralci tripsina, kot 3,4 in 3,5-difluoro substituirane spojine. Do podobne ugotovitve so prišli tudi *Ilič s sodelavci* [57]. Najnižjo konstanto inhibicije od naštetih spojin smo določili spojinama DMI 66H, ki ima fluoridni atom na mestu 4 P3 fenilnega obroča. *Olsen s sodelavci* so iz kristalne strukture med tripsinskim zaviralcem in tripsinom ugotovili, da 4-fluoro substituent tvori interakcije s H-C _{α} -C=O delom Asn98 [66]. Vsem omenjenim spojinam smo izmerili ugoden entropijski prispevek, kar kaže na to, da zaradi fluoridnih atomov na P3 fenilnem obroču lažje izpodrinejo strukturno vodo iz S₃ žepa tripsina [63].

5.3. MOŽNI VZROKI ZA NAPAKE PRI MERITVAH

N predstavlja število vezavnih mest za ligand na proteinu, ob predpostavki da:

- so vsa vezavna mesta identična in neodvisna
- je ves protein pravilno zvit in aktiven
- sta protein in ligand čista
- sta koncentraciji proteina in liganda taki, kot predvidevamo

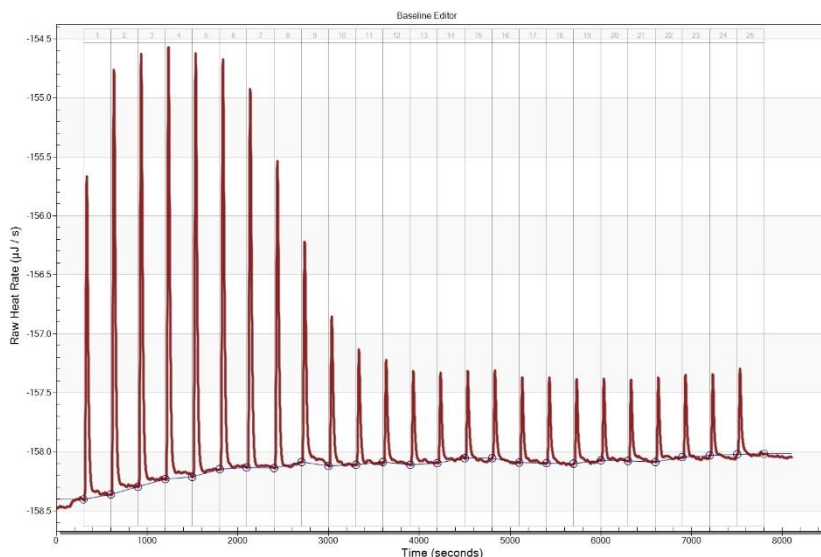
Prav pri vseh titracijah tripsina, razen pri eni, smo izmerili vrednosti n , ki so veliko nižje od 1. To je tudi glavni vzrok, zakaj pri večini termogramov nismo dobili platoja pred prevojem krivulje, temveč je krivulja kmalu po začetku titracije pričela padati.

Vzrokov za opaženo je lahko več.

- protein je bil deloma nepravilno zvit in neaktiven
- prisotne so bile nečistote v proteinu
- koncentracija liganda je bila višja kot predvideno
- koncentracija proteina je bila nižja kot predvideno
- nekooperativni model vezave ni primeren za opis reakcije

Najverjetnejši je prvi vzrok. Titracije smo izvajali na Iliriji (Tržaška cesta 32), protein pa smo hranili v zmrzovalniku v pritličju Fakultete za farmacijo (Aškerčeva cesta 7), ker smo tam imeli tudi ustrezno analitsko tehniko. Tako smo protein večkrat odmrznili, zatehtali ustrezno količino v 2 ml epruveto in ga v vrečki napolnjeni z ledom prenesli na Ilirijo kjer smo epruvete ponovno zamrznili. Pred titracijo smo raztopili tripsin v pufru in raztopino temperirali, da je dosegla temperaturo pri kateri se je izvajala titracija. Poleg tega smo raztopino tripsina še 10 minut razplinjevali. Vse naštetje je lahko imelo neugoden vpliv na stabilnost proteina in je zmanjšalo njegovo aktivnost njegovo aktivnost.

Pri mnogih titracijah smo bili priča naraščanju osnovne ravnine termograma (kot prikazuje slika 30). Taki pojavi niso redki in v kolikor premik ravnine ni prevelik, ne predstavljajo nevarnosti pri analizi podatkov [67].



Slika 32: Termogram z naraščajočo osnovno ravnino.

Tudi pri tem pojavu je možnih več vzrokov.

- nezadostno očiščena kalorimetrična celica
- neujemanje pufrov
- potek encimskih reakcij

Možno je, da je za opaženo odgovorna nezadostno očiščena kalorimetrična celica. Na stenah celice bi lahko bili zaostanki prejšnjih titracij, ki so vplivali na toplotno kapaciteto sistema in omogočili potek nepredvidenih encimskih reakcij.

Po titracijah, pri katerih se je osnovna ravnina dvigovala, smo celico očistili z 10% raztopino Contrad-a (20min), pa se je kljub temu pri naslednji titraciji osnovna ravnina, še vedno dvigovala. Mogoče bi morali celice očistiti še bolj temeljito, saj naj bi pri najtrdovratnejših primerih (Rnaze) čiščenje celice trajalo tudi več dni [67]. Moramo pa ob tem paziti, da z agresivnimi čistilnimi sredstvi ne poškodujemo celice.

Neujemanje pufrov verjetno ni bil vzrok za dvig osnovne ravnine, saj smo protein in ligande raztopili v enakem puffru, razen, če je bil uporabljeni protein liofiliziran v puffru in ne dializiran.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo na izotermnem titracijskem kalorimetru izvedli titracije raztopin tripsina z različnimi tripsinskimi zaviralci in pridobili termodinamski opis vezave zaviralcev na tripsin.

Ugotovili smo, da je vezava tripsinskih zaviralcev DMI 45, DMI 45H, DPD 89, DPD 89H, DPD 112, DPD 112H in KUT 462 entalpijsko vodena, pri vezavi zaviralcev DJI 95, DJI 95H, DMI 65H, DMI 66H, DMI 67H, DMI 68H, DMI 75H in DMI 76H pa sta entalpijski in entropijski prispevek uravnotežena. Vse spojine ob vezavi na tripsin tvorijo ionske interakcije in H-vezi z Asp189, kar je pglavitna interakcija v aktivnem mestu tripsina in glavni vzrok za ugoden entalpijski prispevek ob vezavi.

Večina spojin, ki so substituirane na mestu 6 1,4-benzoksazinskega ogrodja so imele uravnotežen entalpijski in entropijski prispevek. Spojine, ki so substituirane na mestu 7 1,4-benzoksazinskega ali 1,4-benzodioksinskega ogrodja, pa so imele pretežno ugoden entalpijski in neugoden entropijski prispevek k vezavi.

Spojine, ki so 3 in 4-fluoro substituirane na P3 fenilnem obroču, so močnejši tripsinski zaviralci kot pa 3,4 in 3,5-difluoro substituirane spojine. Večina spojin s fluoridnimi atomi na P3 fenilnem obroču ima ugoden entropijski prispevek, kar je verjetno posledica izpodrinjenja strukturne vode iz S₃ žepa tripsina.

7. VIRI IN LITERATURA

- [1] M. F. Dunn, "Protein-Ligand Interactions: General Description" in *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 2001, pp. 1–12.
- [2] Kuriyan, Konforti, and Wemmer, "Molecular Recognition : The Thermodynamics of Binding" *Mol. Life*, pp. 1–58, 2009.
- [3] E. A. Chavelas, R. A. Zubillaga, N. O. Pulido, and E. García-Hernández, "Multithermal titration calorimetry: a rapid method to determine binding heat capacities" *Biophys. Chem.*, vol. 120, no. 1, pp. 10–4, Mar. 2006.
- [4] G. A. Holdgate and W. H. J. Ward, "Measurements of binding thermodynamics in drug discovery" *Drug Discov. Today*, vol. 10, no. 22, pp. 1543–50, Nov. 2005.
- [5] V. Ball and C. Maechling, "Isothermal microcalorimetry to investigate non specific interactions in biophysical chemistry" *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 3283–315, Oct. 2009.
- [6] J. B. Chaires, "Calorimetry and thermodynamics in drug design" *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 37, pp. 135–51, Jan. 2008.
- [7] A. Velázquez Campoy and E. Freire, "ITC in the post-genomic era...? Priceless" *Biophys. Chem.*, vol. 115, no. 2–3, pp. 115–24, Apr. 2005.
- [8] P. D. Ross and S. Subramanian, "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability" *Biochemistry*, vol. 20, no. 11, pp. 3096–3102, May 1981.
- [9] S. Cabani, P. Gianni, V. Mollica, and L. Lepori, "Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution" *J. Solution Chem.*, vol. 10, no. 8, pp. 563–595, Aug. 1981.
- [10] G. P. Connelly, Y. Bai, M. F. Jeng, and S. W. Englander, "Isotope effects in peptide group hydrogen exchange" *Proteins*, vol. 17, no. 1, pp. 87–92, Sep. 1993.
- [11] A. K. Bronowska, "Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design" *Thermodyn. - Interact. Stud. - Solids, Liq. Gases*, pp. 1–49, 2011.
- [12] J. R. Horn, D. Russell, E. A. Lewis, and K. P. Murphy, "Van't Hoff and calorimetric enthalpies from isothermal titration calorimetry: are there significant discrepancies?" *Biochemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 1774–8, Feb. 2001.
- [13] Y. Liu and J. M. Sturtevant, "Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. II" *Protein Sci.*, vol. 4, no. 12, pp. 2559–61, Dec. 1995.

- [14] H. Naghibi, A. Tamura, and J. M. Sturtevant, "Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 12, pp. 5597–9, Jun. 1995.
- [15] T. S. G. Olsson, J. E. Ladbury, W. R. Pitt, and M. A. Williams, "Extent of enthalpy-entropy compensation in protein-ligand interactions" *Protein Sci.*, vol. 20, no. 9, pp. 1607–18, Sep. 2011.
- [16] U. Gerhard, M. S. Searle, and D. H. Williams, "The free energy change of restricting a bond rotation in the binding of peptide analogues to vancomycin group antibiotics" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 3, no. 5, pp. 803–808, May 1993.
- [17] C. A. Chang, W. Chen, and M. K. Gilson, "Ligand configurational entropy and protein binding" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 5, pp. 1534–9, Jan. 2007.
- [18] J. E. DeLorbe, J. H. Clements, M. G. Teresk, A. P. Benfield, H. R. Plake, L. E. Millspaugh, and S. F. Martin, "Thermodynamic and structural effects of conformational constraints in protein-ligand interactions. Entropic paradox associated with ligand preorganization" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 46, pp. 16758–70, Nov. 2009.
- [19] S. Kunugi, Y. Yanagi, and K. Oda, "Studies on the formation and stability of a complex between Streptomyces proteinaceous metalloprotease inhibitor and thermolysin" *Eur. J. Biochem.*, vol. 259, no. 3, pp. 815–20, Feb. 1999.
- [20] S. Fischer and C. S. Verma, "Binding of buried structural water increases the flexibility of proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 17, pp. 9613–5, Aug. 1999.
- [21] M. S. Searle and D. H. Williams, "The cost of conformational order: entropy changes in molecular associations" *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 27, pp. 10690–10697, Dec. 1992.
- [22] A. Velazquez-Campoy, S. Muzammil, H. Ohtaka, A. Schön, S. Vega, and E. Freire, "Structural and thermodynamic basis of resistance to HIV-1 protease inhibition: implications for inhibitor design" *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.*, vol. 3, no. 4, pp. 311–28, Dec. 2003.
- [23] A. Velazquez-Campoy, I. Luque, M. J. Todd, M. Milutinovich, Y. Kiso, and E. Freire, "Thermodynamic dissection of the binding energetics of KNI-272, a potent HIV-1 protease inhibitor" *Protein Sci.*, vol. 9, no. 9, pp. 1801–9, Sep. 2000.
- [24] N. M. King, M. Prabu-Jeyabalan, R. M. Bandaranayake, M. N. L. Nalam, E. A. Nalivaika, A. Özen, T. Haliloğlu, N. K. Yılmaz, and C. A. Schiffer, "Extreme Entropy–Enthalpy Compensation in a Drug-Resistant Variant of HIV-1 Protease" *ACS Chem. Biol.*, vol. 7, no. 9, pp. 1536–1546, Sep. 2012.

- [25] A. Velazquez-Campoy, M. J. Todd, and E. Freire, "HIV-1 protease inhibitors: enthalpic versus entropic optimization of the binding affinity" *Biochemistry*, vol. 39, no. 9, pp. 2201–7, Mar. 2000.
- [26] A. Velazquez-Campoy and E. Freire, "Incorporating target heterogeneity in drug design" *J. Cell. Biochem. Suppl.*, vol. Suppl 37, pp. 82–8, Jan. 2001.
- [27] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, "Noncovalent Bonds" W. H. Freeman, 2000.
- [28] J. Naish and D. S. Court, *Medical Sciences*. Elsevier Health Sciences UK, 2014.
- [29] M. Urbakh and J. Klafter, "Dipole-dipole interactions near interfaces" *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 13, pp. 3344–3349, Apr. 1993.
- [30] K. A. Dill, "Dominant forces in protein folding" *Biochemistry*, vol. 29, no. 31, pp. 7133–7155, Aug. 1990.
- [31] B. Bagchi, *Water in Biological and Chemical Processes: From Structure and Dynamics to Function*, vol. 14. Cambridge University Press, 2013.
- [32] D. A. Dougherty, "Cation- π Interactions Involving Aromatic Amino Acids" *J. Nutr.*, vol. 137, no. 6, p. 1504S–1508, Jun. 2007.
- [33] B. Fegley and R. Osborne, *Practical Chemical Thermodynamics for Geoscientists*. Academic Press, 2013.
- [34] *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*. John Wiley & Sons, 2005.
- [35] S. Gaisford and M. O'Neill, "Pharmaceutical Isothermal Calorimetry" 2006.
- [36] A. E. Beezer, *Biological microcalorimetry*. London: Academic Press, 1980.
- [37] A. C. Buchholz and D. A. Schoeller, "Is a calorie a calorie?" *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, p. 899S–906S, May 2004.
- [38] R. Perozzo, G. Folkers, and L. Scapozza, "Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects" *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, vol. 24, no. 1–2, pp. 1–52, 2004.
- [39] M. W. Freyer and E. a. Lewis, "Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions" *Methods Cell Biol.*, vol. 84, no. 07, pp. 79–113, 2008.
- [40] I. Wadsö, "Neither calorimeters nor calorimetrists are what they used to be" *Thermochim. Acta*, vol. 300, no. 1–2, pp. 1–5, Oct. 1997.

- [41] E. Freire, O. L. Mayorga, and M. Straume, “Isothermal titration calorimetry” *Anal. Chem.*, vol. 62, no. 18, p. 950A–959A, Sep. 1990.
- [42] A. Brown, “Analysis of cooperativity by isothermal titration calorimetry” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 3457–77, Oct. 2009.
- [43] O. Braissant, D. Wirz, B. Göpfert, and A. U. Daniels, “Biomedical use of isothermal microcalorimeters” *Sensors (Basel)*, vol. 10, no. 10, pp. 9369–83, Jan. 2010.
- [44] L. Garcí-a-Fuentes, Ramiro, Teñllez-Sanz, I. Quesada-Soriano, and C. Baroñn, “Thermodynamics of Molecular Recognition by Calorimetry” Sep. 2011.
- [45] T. T. Baird, Jr. and C. S. Craik, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier, 2013.
- [46] M. Braia, G. Tubio, B. Nerli, W. Loh, and D. Romanini, “Analysis of the interactions between Eudragit® L100 and porcine pancreatic trypsin by calorimetric techniques” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 50, no. 1, pp. 180–6, Jan. 2012.
- [47] M. A. Salameh and E. S. Radisky, “Biochemical and structural insights into mesotrypsin: an unusual human trypsin.” *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 4, no. 3, pp. 129–39, Jan. 2013.
- [48] C. Aguirre, I. Condado-Morales, L. F. Olguin, and M. Costas, “Isothermal titration calorimetry determination of individual rate constants of trypsin catalytic activity” *Anal. Biochem.*, vol. 479, pp. 18–27, Jun. 2015.
- [49] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, “Proteases: Facilitating a Difficult Reaction” W H Freeman, Ch. 9.1, 2002.
- [50] T. Brandt, N. Holzmann, L. Muley, M. Khayat, C. Wegscheid-Gerlach, B. Baum, A. Heine, D. Hangauer, and G. Klebe, “Congeneric but still distinct: how closely related trypsin ligands exhibit different thermodynamic and structural properties” *J. Mol. Biol.*, vol. 405, no. 5, pp. 1170–87, Feb. 2011.
- [51] P. Czodrowski, C. A. Sotriffer, and G. Klebe, “Protonation changes upon ligand binding to trypsin and thrombin: structural interpretation based on pK(a) calculations and ITC experiments” *J. Mol. Biol.*, vol. 367, no. 5, pp. 1347–56, Apr. 2007.
- [52] C. A. Holland, A. T. Henry, H. C. Whinna, and F. C. Church, “Effect of oligodeoxynucleotide thrombin aptamer on thrombin inhibition by heparin cofactor II and antithrombin” *FEBS Lett.*, vol. 484, no. 2, pp. 87–91, Nov. 2000.
- [53] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, and L. N. Lin, “Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter” *Anal. Biochem.*, vol. 179, no. 1, pp. 131–7, May 1989.
- [54] B. M. Baker and K. P. Murphy, “Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry” *Biophys. J.*, vol. 71, no. 4, pp. 2049–55, Oct. 1996.

- [55] S. Iqbal, A. Mishra, and M. T. Hoque, "Improved prediction of accessible surface area results in efficient energy function application" *J. Theor. Biol.*, vol. 380, pp. 380–91, Sep. 2015.
- [56] S. J. Wodak and J. Janin, "Analytical approximation to the accessible surface area of proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 4, pp. 1736–40, Apr. 1980.
- [57] M. Ilić, D. Kikelj, and J. Ilaš, "Fluorinated dual antithrombotic compounds based on 1,4-benzoxazine scaffold" *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 50, pp. 255–63, Apr. 2012.
- [58] M. Ilić, P. Dunkel, J. Ilaš, E. Chabielska, A. Zakrzaska, P. Mátyus, and D. Kikelj, "Towards dual antithrombotic compounds - balancing thrombin inhibitory and fibrinogen GPIIb/IIIa binding inhibitory activities of 2,3-dihydro-1,4-benzodioxine derivatives through regio- and stereoisomerism" *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 62, pp. 329–40, Apr. 2013.
- [59] U. Trstenjak, J. Ilaš, and D. Kikelj, "Low molecular weight dual inhibitors of factor Xa and fibrinogen binding to GPIIb/IIIa with highly overlapped pharmacophores" *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 64, pp. 302–13, Jun. 2013.
- [60] R. N. Goldberg, "Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers" *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 31, no. 2, p. 231, Apr. 1999.
- [61] N. A. Demarse, C. F. Quinn, D. L. Eggett, D. J. Russell, and L. D. Hansen, "Calibration of nanowatt isothermal titration calorimeters with overflow reaction vessels" *Anal. Biochem.*, vol. 417, no. 2, pp. 247–55, Oct. 2011.
- [62] W. Bode and R. Huber, "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases" *Eur. J. Biochem.*, vol. 204, no. 2, pp. 433–51, Mar. 1992.
- [63] B. Baum, L. Muley, A. Heine, M. Smolinski, D. Hangauer, and G. Klebe, "Think twice: understanding the high potency of bis(phenyl)methane inhibitors of thrombin" *J. Mol. Biol.*, vol. 391, no. 3, pp. 552–64, Aug. 2009.
- [64] J. A. Bertrand, J. Oleksyszyn, C. M. Kam, B. Boduszek, S. Presnell, R. R. Plaskon, F. L. Suddath, J. C. Powers, and L. D. Williams, "Inhibition of trypsin and thrombin by amino(4-amidinophenyl)methanephosphonate diphenyl ester derivatives: X-ray structures and molecular models" *Biochemistry*, vol. 35, no. 10, pp. 3147–55, Mar. 1996.
- [65] T. Brandt, N. Holzmann, L. Muley, M. Khayat, C. Wegscheid-Gerlach, B. Baum, A. Heine, D. Hangauer, and G. Klebe, "Congeneric but still distinct: how closely related trypsin ligands exhibit different thermodynamic and structural properties" *J. Mol. Biol.*, vol. 405, no. 5, pp. 1170–87, Feb. 2011.
- [66] J. A. Olsen, D. W. Banner, P. Seiler, B. Wagner, T. Tschopp, U. Obst-Sander, M. Kansy, K. Müller, and F. Diederich, "Fluorine interactions at the thrombin active site: protein backbone fragments H-C(α)-C=O comprise a favorable C-F environment

and interactions of C-F with electrophiles” *Chembiochem*, vol. 5, no. 5, pp. 666–75, May 2004.

- [67] N. N. Salim and A. L. Feig, “Isothermal titration calorimetry of RNA” *Methods*, vol. 47, no. 3, pp. 198–205, Mar. 2009.