

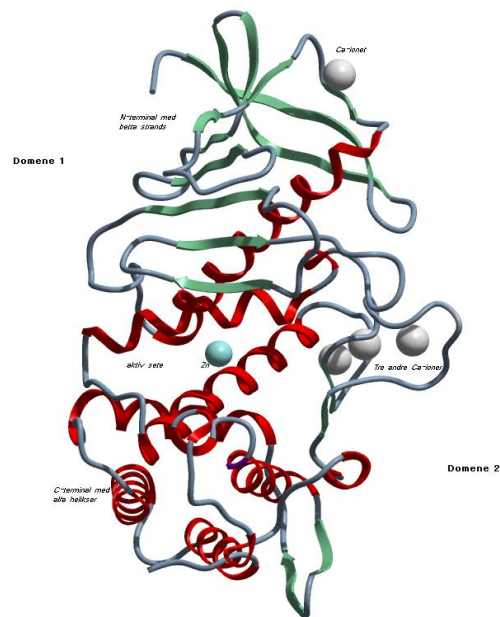


Master oppgave i Farmakologi

**Eksperimentell in vitro "screening" og molekylær dökking av  
forbindelser med mulig hemmende effekt på Thermolysin og Pseudolysin**

Irina Bilto

May 2011



Institutt for Farmasi

Universitetet i Tromsø

Tromsø, Norge



# Eksperimentell in vitro "screening" og molekylær dokking av forbindelser med mulig hemmende effekt på Thermolysin og Pseudolysin.

## Innhold:

Forord	6
Sammendrag	7
Forkortelsesliste	8
1. Introduksjon	10
1.1. Enzymer	10
1.1.1. Hvorfor enzymene er så viktig	11
1.1.2. Klassifisering av Zn-holdige metallopeptidaser	12
1.1.3. Likhetstrekk mellom M4 familiemedlemmer	13
1.1.4. Forskjeller mellom subklanene	14
1.1.5. Thermolysin og Pseudolysin	15
1.1.6. Strukturelle likheter og forskjeller mellom Thermolysin og Pseudolysin	15
1.1.7. Katalytisk mekanisme til Thermolysin og Pseudolysin	18
1.1.8. Chelaterende forbindelser	21
1.2. Enzymkinetikk	22
1.2.1. Michaelis-Menten enzym kinetikk	22
1.2.2. Lineweaver-Burk kinetikk	26
1.2.3. Kompetitiv hemning	27
1.2.4. Unkompetitiv hemning	29
1.2.5. Miksed hemning	31
1.3. Generelt om hemmerer	33
1.3.1. Dose-respons kurve	33
1.3.2. $IC_{50}$ og $K_i$ betydning og beregninger	34
1.4. Ultrafiolet (UV) spektrofotometri	36

1.5. Fluorescens fotometri	38
1.6. Dokking	38
1.6.1.Dokking som en del av en Virtual ligand screening prosess	38
1.6.2.Fordeller og ulemper ved dokking	42
2. Formålet med studien	43
3. Materialer og metoder	44
3.1. Materiale	44
3.1.1.Forbindelser	44
3.1.2.Buffersammensetning	53
3.1.3.Enzym assay	54
3.1.4. Substrat assay	54
3.1.5.DMSO	56
3.2. Apparater, maskinvare og metoder	57
3.2.1.Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence spektrometer LS 50 B	57
3.2.2. Spectra MAX Gemini EM fluorometer	57
3.2.3.SigmaPlot og Enzym Kinetikk dataverktøy	59
3.2.4. ICM	59
3.3. Utføring av forsøkene	60
3.3.1.Enzymkinetikk. $K_m$ bestemmelse	60
3.3.2. Eksperimenter med bindings assay og plateleser	60
3.3.3.Bestemmelse av reel konsentrasjon av Galardin.	61
3.3.4.Kontroll forsøk med Galardin	62
3.3.5.Hemningsmekanismer	63
4. Resultater og diskusjon	64
4.1. Enzymkinetikk	65
4.2. Galardin	66
4.3. $IC_{50}$ verdier	68
4.4. Maybreedde forbindelser	76
4.5. Enzymkinetikk	77

4.6. Dokking	81
5. Feilkilder	89
6. Konklusjon	90
7. Videre arbeid	91
8. Referanseliste	93
9. Appendix	98

## Forord

Arbeidet ble utført ved Forskningsgruppe for Medisinsk farmakologi og toksikologi og Tumorbiologisk forskningsgruppe, Institutt for Medisinsk Biologi ved Universitetet i Tromsø i perioden 01.10.2010 til 20.05.2011. Målet med oppgaven var å undersøke forbindelser ved hjelp av eksperimentelle studier (bindingsstudier og enzymkinetikk) og molekylmodellering for å finne gode og selektive hemmere av enzymene Thermolysin og Pseudolysin. Hovedvekt ble lagt på det eksperimentelle arbeidet. Med all respekt vil jeg gi en stor takk til veilederne: Professor Ingebrigt Sylte, Professor Jan-Olof Winberg, første emanuensis Olayiwola A. Adekoya, og andre utrolig snille mennesker ved fakultetet som har gjort min opphold ved fakultetet til en trivelig opplevelse. Vil også takke Eli Berg for all hjelp. Takk til Stian Sjøli for de lange koridorsamtalene.

En spesiell takk til Professor Jan-Olof Winberg og Professor Ingebrigt Sylte for enorm tålmodighet og fantastisk veiledning.

Uten deres hjelp skulle jeg aldri kommet så langt jeg har kommet. Den forståelse for faget jeg har fått ved deres hjelp ville jeg aldri fått bare ved å lese bøker. Dere var alltid til stede når jeg trengte dere, og jeg følte meg trygg og engasjert i det jeg gjort av den grunn. Følelsen av å gjøre noe viktig var en drivkraft i prosessen, og den følelse har jeg fått takket vare dere. Håper at resultatene jeg har kommet frem til vil være til hjelp i deres videre forskning.

Deres kunnskaper er udiskutabelt veldig viktig or prosjekter dere er involvert i og for å "dyrke" frem og veilede nye "perler" ut i den vitenskapelige verden.

Vil også si tusen takk til mine barn Jaroslav og Martin som i forhold til alderen har vist forståelse, og har prøvd å hjelpe meg og har taklet så godt de kunnet situasjon på hjemmefronten i sammenheng med mitt arbeide med Master oppgaven. Håper jeg vært et godt eksempel for dem, og kanskje en dag skal de også ta sin Master grad til min store glede.

Tusen takk!

## Sammendrag

To substrater ble brukt i de eksperimentelle studiene. De er referert til som Bradykinin-lignende substrat og AGLA substrat i oppgaven. De eksperimentelle forsøkene gav  $K_m$  verdi for Bradykinin lignende substrat for Thermolysin fra *Bacillus thermoproteolyticus* eubakterie på  $17.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$  og Pseudolysin fra *Pseudomonas aeruginosa* på  $7.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ . For "AGLA" substrat ble  $K_m$  for Thermolysin målt til  $67.7 \pm 10.5 \mu\text{M}$ , mens for Pseudolysin ble  $K_m$  målt til  $124.8 \pm 22.9 \mu\text{M}$ . Seksten forbindelser fra en tidligere "virtual screening" studie av Maybridge databasen viste ingen hemmende effekt hverken på verken Thermolysin eller Pseudolysin. Både under preinkubering av hemmere og under alle forsøk var pH 7.3, mens temperaturen var  $37^\circ\text{C}$ . Av totalt 50 forbindelser (42+8) fra samarbeidspartnere i Italia, viste forbindelse FF33 en  $\text{IC}_{50}$  på 754 nM mot Thermolysin og  $\text{IC}_{50}$  på  $2.28 \mu\text{M}$  mot Pseudolysin. Forbindelse VDL22 hadde en  $\text{IC}_{50}$  på  $11,14 \mu\text{M}$  mot Thermolysin. Forbindelse SM434 viste seg å være en Pseudolysin hemmer med  $\text{IC}_{50} = 9.21 \mu\text{M}$  og  $K_i = 5.98 \mu\text{M}$  ved bruk av Bradykinin-lignende substrat. Dokking av SM434 inn i det aktive sertet av PsE tydet på at forbindelsen ikke koordinerer det katalytiske zinc atomet. Dette er en interessant observasjon siden man antar at spesifikke hemmere må binde til bindings seter som ikke inkluderer det katalytiske Zinc atomet, siden katalytisk Zinc finnes i alle zinc metalloproteaser. Forbindelsene FF 33, BF 282, SM 434 viste seg å være kompetitive hemmere av Thermolysin og Pseudolysin ved bruk av Bradykinin-lignende substrat. Forbindelse VDL 22 viste å være ukompetitiv hemmer av Pseudolysin ved bruk av Bradykinin lignende substrat. Galardin hadde en hemmende effekt både mot Thermolysin ( $\text{IC}_{50} = 12.20 \text{ nM}$  og  $K_i = 9.95 \text{ nM}$ ) og Pseudolysin ( $\text{IC}_{50} = 24.35 \text{ nM}$  og  $K_i = 15.80 \text{ nM}$ ) ved bruk av Bradykinin-lignende substrat.

## Forkortelser

ACE -1 – Angeotensin Converting Enzyme

ADME – Administrasjon, Distribusjon, Metabolisme, Ekskresjon

”AGLA” substrat - Abz- Ala-Gly-Leu-Ala – Nba

BLS - Bradykinin lignende substrat - Mca – Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys – Dnp – OH

Dnp - 2,4-dinitrophenyl

DMSO- Dimethyl sulfoxide

[E] – enzym konsentrasjon

ES – enzym-substrat kompleks

EI – enzym-hemmer kompleks

ESI – enzym-substrat-hemmer kompleks

HTS - high-throughput screening

[I] – hemmer konsentrasjon

IC<sub>50</sub> – hemmer konsentrasjon nødvendig for å hemme enzym aktivitet med 50 % in vitro

ICM – Internal coordinate mechanics

K<sub>i</sub> – inhiberings konstant

k<sub>i</sub> - reaksjonshastighets konstanten for dannelse av enzym-hemmer komplekse.

k<sub>i</sub>' - er reaksjonshastighet konstanten for dannelse av enzym-substrat-hemmer komplekset.

K<sub>m</sub> - Michaelis- Menten konstanten

LB plot – dobbelt reciprokal eller Lineweaver-Burk plot

LM – legemiddel



Mca - (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl

MEROPS – en informasjon data base for peptidaser

MM plot – Michaelis - Menten kurve

MMP – Matriks metalloproteaser

PDB – Protein Data Bank

PsE – pseudolysin

[S] – substrat konsentrasjon

TLPs – thermolysin lignende proteaser

TLN – thermolysin

UV – ultrafiolett

$V_i$  – eksperimentelt bestemt verdi for hastighetsforandringer i fluorescens ved hemmer tilstede

$V_0$  – reaksjons hastighet nær nullpunkt hvor grafen er tilnærmet lineær

$V_{max}$  – maksimum av reaksjons hastighet

VS – virtual skrining

ZBG – Zn bindende gruppe

3D – tredimesjonal

# 1. Introduksjon.

## 1.1. Enzymer

Enzymer er polypeptider, store polymerer av fra hundre til tusenvis av aminosyrer som er bundet sammen ved hjelp av kovalente peptidbindinger. Aminosyrer varierer i dets syre-base egenskaper og størrelse. En kjemisk forbindelse i en polymer som er viktig for enzymets biologiske funksjon, men som ikke er av aminosyre opprinnelse, kalles prostetisk gruppe eller co-faktor. Eksempler på slike faktorer er sukkergrupper, lipidgrupper og metallioner (Zn, Mg, Mn, Fe, Ca).

Bortsett av en liten gruppe av katalytiske RNA molekyler (involvert i fjerning av introner eller som substrat for andre RNA molekyler) er alle enzymer proteiner.

Proteinstrukturer kan deles i fire nivå: 1. Primær struktur som består av aminosyresekvens samt disulfidbruer. 2. Sekundær struktur som består av relativt stabile aggregater av aminosyresekvenser som danner  $\alpha$ -helikser,  $\beta$ -"sheet" eller  $\beta$ -"turn". 3. Tertiære struktur som er den tredimensjonale (3D) folding av en polypeptid subenhet. 4. Quaternær struktur som er satt sammen av 3D strukturer til alle polypeptidene til proteinet.

Den tredimensjonale foldinga (3D struktur) til et protein avhenger av aminosyresekvensen. Funksjonen i sin tur er avhengig av enzymets 3D struktur. De viktigste kreftene som hjelper et protein til å holde på sin 3D struktur (konformasjon) er ikke-kovalente bindinger som disulfidbindinger, hydrogenbindinger, hydrofobiske og ioniske interaksjoner. Disse bindinger er vanligvis ikke sterke hver for seg, men i en 3D proteinstruktur deltar tusenvis av disse bindingene, og danner en stabil struktur.

Enzymer og proteiner generelt eksisterer i flere stabile strukturelle konformasjoner og er ikke en statisk struktur. Generelt vil proteiner befine seg i konformasjonen med lavest fri energi (mest stabile konformasjon) som gir maksimum antall av gunstige interaksjoner. Et område på enzymets overflate hvor katalysereaksjonen finner sted kalles enzymets aktive sete.

Aminosyresekvenser som er viktig for enzymets aktivitet har blitt lagret og modifisert i løpet av evolusjonen avhengig av omgivelsene. Residier som var minst viktig for funksjonen ble erstattet med andre over tid ved hjelp av mutasjoner. Informasjon om proteinstruktur er ikke bare av interesse for forståelse av prosesser i kroppen og utvikling av legemidler, kosmetikk og matvarer, men hjelper oss også til å få informasjon om evolusjonen.

### 1.1.1. Hvorfor enzymene er så viktig

Forandring i livstil, utvikling av nye teknologier, ny kunnskap, nye og mer effektive medisiner og fravær av farlige sykdommer har sammen med flere andre faktorer ledet til en økt gjennomsnittsalder i befolkningen. Men samtidig som det har blitt mindre akutte og farlige sykdommer, har det blitt mer av langsvarige kroniske sykdommer og livstil relaterte sykdommer. Dette og utviklingen av bakteriell resistens for antibiotika har ført til et stort behov for å utvikle nye legemidler. Farmasøytiske selskaper og forskningsgrupper ved Universiteter i rike land investerer enorme resurser i å utvikle ny legemidler mot sykdommer som migrene, bakterielle og virale infeksjoner, hjerte-kar sykdommer, ulcer, kreft, depresjon og fedme.

Oppdagelse og utvikling av nye forbindelser som kan være potensielle legemidler er en vanskelig og tidskrevende prosess. Det hele starter med oppdagelse av nye substanser (kan være hundrevis til å begynne med) som kan bindes til et target med sterk affinitet og spesifisitet etterfulgt av en utviklingsprosess rettet mot kjemisk syntese av lovende molekyler. Disse i sin tur blir testet eksperimentelt in vitro og på celle kulturer i laboratorier. Ny metoder og stadig ny og avansert programvare og måleinstrumenter utvikles i den vitenskapelig verden. Videre følger in vivo studier som først utføres på cellekulturer i laboratorier og deretter på levende mus og/eller rotter, og antall lovende forbindelser reduseres til bare noen få. Videre følger design av formulering og flere trinn med kliniske studier på friske og så syke populasjoner av mennesker. Det tar i gjennomsnitt 10-15 år fra potensielle molekylerne blir oppdaget til vi får et legemiddel på marked. Penge og resursinvestering er enorm.

Enzymer spiller en hovedrolle i de fleste biologiske prosesser, både fysiologisk og patofysiologisk, og derfor er isolering av nye enzymer og kartlegging av enzymets egenskaper avgjørende for utvikling av nye legemidler. Utvikling av hemmere av visse enzymer har avgjørende rolle ved behandling av mange patologiske prosesser i kroppen. Enzymer representerer nesten halvparten av drug targets for små lavmolekylære legemiddel (LM) molekyler.<sup>1-3</sup>

Per i dag er det allerede mange legemidler, som er enzymhemmerer på marked. Blant disse er midler mot kreft (Fluorouracil, Methotrexate), antibiotika (Amoxicillin), antivirale midler (Acyclovir, Ritonavir), legemidler mot parkinson (Carbidopa), antihypertensive legemidler (Enalapril), kolesterolsenkemidler (Statiner) med flere.<sup>1</sup>

### 1.1.2. Klassifisering av Zn-holdige metallopeptidaser

Enzymene klassifiseres etter reaksjonene de katalyserer (Tabell 1). Det adderes et suffiks "-ase" til enzymets substratnavn eller til ordet som beskriver enzymets aktivitet. Noen enzymer har et eller flere navn, eller to forskjellige enzymer kan ha et og samme navn. På grunn av at det stadig oppdages nye enzymer, og for å inngå internasjonal enighet for navngiving ble det utarbeidet et Internasjonalt klassifiseringssystem for enzymer. Dette systemet deler enzymer i 6 klasser og disse klassene i sin tur deles i sub- og sub-sub klasser basert på type reaksjon enzymet katalyserer.<sup>4</sup>

**Tabell 1.** Internasjonal klassifisering av enzymer.<sup>4</sup>

nr.	klasse navn	Type av reaksjon katalysert
1	Oxidoreductases	Overføring av elektroner (hydrid ioner eller H atomer)
2	Transferases	Gruppe overførings reaksjoner
3	Hydrolases	Hydrolysis reaksjoner (overføring av funksjonelle grupper til vann molekylle)
4	Lyases	Addering av grupper til dobbeltbindinger, eller dannelse av dobbeltbindinger via fjerning av grupper
5	Isomerases	Overføring av grupper innenfor samme molekyle for å danne en isomer
6	Ligases	Dannelse av C-C, C-S, C-O, C-N bindinger via kondenserings reaksjoner

Hvert enzym får i dette systemet et firedelet nummer. Thermolysin fra *Bacillus thermoproteolyticus* har nummeret 3.4.24.27 (). Det første tallet (3) viser til enzymets klassenummer, og 3 står for at enzymet er en hydrolase. Det andre tallet (4) viser subklassenummer, og 4 viser at enzymet er en peptidase. Tredje taller (24) viser til sub-sub klassenummer, og 24 betyr at enzymet er en metalloendopeptidase. Fjerde tallet (27) viser at dette et enzym nr. 27 blant metalloendopeptidaser som er TLN. For PsE er siste tallet 26, noe som viser at PsE er enzym 26 i subklassen.<sup>5</sup>

### 1.1.3. Likhetstrekk mellom M4 familiemedlemmer

Både TLN (fra *Bacillus thermoproteolyticus*) og PsE (extracellulær elastase fra *Pseudomonas aeruginosa*) er medlemmer av M4 familien av metallopeptidaser (synonymer for peptidaser er proteaser, proteinaser, og peptid binding hydrolase) i følge MEROPs klassifiseringssystemet.<sup>6,7</sup> Alle medlemmene i familien har et katalytisk Zn<sup>2+</sup> ion som binder til et HEXXH motiv på aktivt sete. Derfor kalles disse enzymer Zn-avhengige metallopeptidaser. Av alle metallopeptidaser er foreløpig den katalytiske mekanismen til TLN mest kjent. Per i dag (04.2011) er det 508 sekvenser av M4 familie medlemmer i Merops databasen, mens det var 81 i 2009.<sup>7,8</sup>

Zn holdige peptidaser er en av de fire vanlige typene av proteinaser og består av mer enn 30 familier som alle tilhører Klan MA etter MEROPs klassifisering. Alle disse enzymene kalles for TLN like proteaser (TLPs) på grunn av at TLN var et av de første Zn metallopeptidasene hvor både aminosyresekvensen og 3D struktur ble kartlagt.<sup>9-12</sup> Klan MA deles i subklaner MA(E) og MA(M) og inneholder de mest lovende og industrielt relevante metalloproteasene.<sup>13</sup> Felles for peptidaser i begge subklaner er at alle er Zn-holdige, og at de har et HEXXH motiv innkorporert i det katalytiske domenet (X er hvilken som helst aminosyre). Aminosyresekvensene viser fellestrekk mellom subklanene i det katalytisk domenet og i det aktive setet, men det finnes også forskjeller (Figur 1). Felles for begge subklanene er at to av ligandene i HEXXH katalytisk domene som koordinerer Zn<sup>2+</sup> er Histidin og at den fjerde liganden er et vann molekyl.<sup>7</sup>

M04.001: thermolysin [1NPC](#)



aktiv sete sekvens (a)

M04.001: thermolysin [1TLP](#)



aktiv sete sekvens (b)

M04.005: pseudolysin [1EZM](#)



aktiv sete sekvens (c)

**Figur 1.** Figuren er modifisert fra referanse 14. Figuren viser sekundærstrukturene til peptidaser i M4 familien. Sekundær struktur til TLN fra *Bacillus cereus* (PDB kode: 1NPC) og TLN fra *Bacillus thermoproteolyticus* (PDB kode: 1TLP) og PsE fra *Pseudomonas aeruginosa* (PDB kode: 1EZM). Røde bokser symboliserer  $\alpha$ -helligser og grønne bokser  $\beta$ -"sheets". Aktivt sete sekvensen HEXXH (a, b, c) viser store likhetstrekk mellom enzymene.<sup>14</sup> Internettside opprettet 31-January-2011.

#### 1.1.4. Forskjeller mellom subklanene

En viktig forskjell mellom subklanene er knyttet til tredje Zn-koordinerende ligand. TLN tilhører M4 familien under subklan MA(E). Enzymene som tilhører MA(E) subklanen kalles også for "Glu-zincins". Navnet baserer seg på at tredje Zn-koordinerende ligand er en Glutamat aminosyre (E) som er lokalisert cirka 18-72 aminosyrer C-terminalt for HEXXH motivet.

Matriks metalloproteinaser (MMPs) tilhører M10 familien og subklan MA(M). Disse er kjent som "Met-zincins". Den tredje Zn-koordinerende liganden er et Histidin eller et Aspartat lokalisert i et forlenget motiv ved enzymets katalytisk sete HEXXHGX(H/D), mens C-terminal regionen inneholder stor akkumulering av aminosyren Metionin (Met) lokalisert nært den tredje Zn-koordinerende liganden Histidin, og danner en såkalt "Met-turn". "Met-turn" utgjør den største spesifikke struktur forskjellen mellom enzymene i subklan MA(E) og subklan MA(M).

### 1.1.5. Thermolysin og Pseudolysin

Thermolysin (TLN, 34.6 kDa, EC 3.4.24.27) fra den gram positiv bakterien *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko er en varmemestabil ekstrasellulær metalloendopeptidase og prototype for andre TLPs. Siden TLN er et ganske stabilt enzym og det mest studerte av alle Zn-holdige metalloproteinaser, ble TLN brukt som et modellenzym for å utvikle ny og potente hemmere av andre TLPs.

TLPs fra *B.stearothermophilus* og *B.caldolyticus* er veldig lik TLN, men sammenlignet med TLPs fra *B.cereus* og *B.subtilis* er likheten mindre.<sup>13</sup>

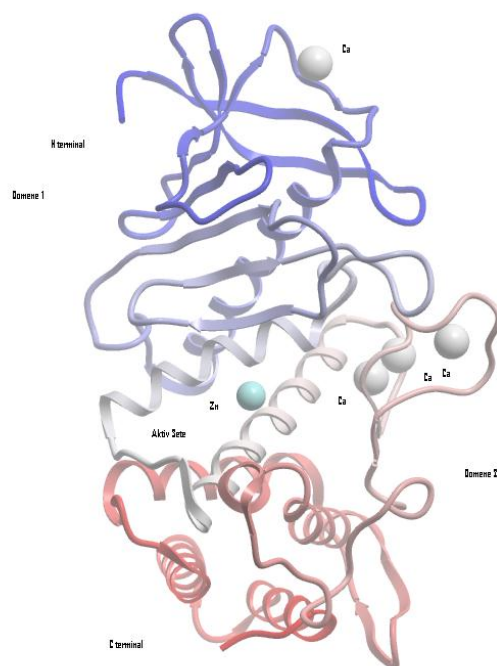
TLPs fra *Helicobacter pylori* og *Vibrio cholerae* er involvert i patogenesen av disse mikroorganismene. Sykdommer som de forårsaker inkluderer gastritt, magesår, gastric carcinoma og kolera.<sup>15</sup> TLPs fra *Legionella* viste seg å være mulige virulens faktorer og årsak til Legionær sykdom og pneumonia.<sup>16</sup> Coccolysin fra *Enterococcus faecalis* er en annen TLPs og er ansvarlig for blant annet matforgiftning, urinveis infeksjoner og mange andre opportunistiske infeksjoner forårsaket av *Enterococcus faecalis*.<sup>17</sup>

Pseudolysin (PsE, 30.0 kDa, EC 3.4.24.26) er også et annet medlem av M4 familien. PsE er ekstracellulær elastase til *Pseudomonas aeruginosa*, og viktig for patogenese til *P.aeruginosa* infeksjoner.<sup>18-20</sup> Sammenhengen mellom sykdomstilstand og PsE kan være direkte ved at PsE ødelegger affisert vev og cellefunksjoner, eller indirekte ved at PsE påvirker vertens forsvarsmekanismer.<sup>21</sup> PsE kløyver blant annet human bronkial mucosal proteinase hemmer<sup>22</sup>, ødelegger muskelvev<sup>19</sup> og er forbundet med lungeinfeksjoner.<sup>23,24</sup> Sterke bevis eksisterer på at PsE er involvert i kroniske magesår tilstander hvor den ødelegger hud proteaser og forstyrrer helingsprosesser.<sup>25</sup>

### 1.1.6. Strukturelle likheter og forskjellene mellom TLN og PsE

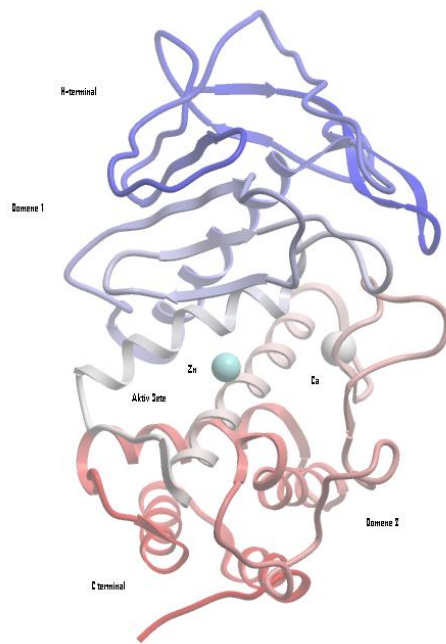
3D strukturen til PsE er veldig lik 3D strukturen til TLN.<sup>26</sup> TLN (Figur 2) består av 316 aminosyre residier, fire kalsium ioner som antatt å bidra til enzymets termostabilitet (mindre termostabile TLN- lignende enzymer inneholder bare to kalsium ioner<sup>9,10</sup>) og en zink ion, antatt å ha en hovedrolle ved katalyse (Figur 5).<sup>11,27-29</sup> PsE strukturen (Figur 3) med sine 301 aminosyre residier inneholder bare et kalsium ion og to disulfid bruer i strukturen, og et zink ion nødvendig for katalyse. TLN foretrekker å kløyve peptid bindinger ved N-terminalen mellom store og hydrofobe aminosyrer som Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe), Valin (Val), og Ile. PsE foretrekker å kløyve peptidbindinger ved N-terminalen mellom aromatiske aminosyrer. Begge enzymene har en struktur bestående av to domener med et aktiv sete mellom domenene. N-terminal domene inneholder mest  $\beta$ - "sheets", mens C-terminal domene består hovedsakelig av  $\alpha$ - helikser.<sup>21</sup> Strukturell

forskjellen mellom TLN og PsE, som kan være viktig for ligand binding er knyttet til størrelsen på det aktive setet og aminosyresekvensen i bindingslommene. Aktivt sete "kløft" er mer åpen hos PsE.<sup>26</sup> Siden TLN er produsert av termofile bakterier av *Bacillus* arter, så er TLN relativt mer termostabil enn andre metalloproteaser produsert av mindre termostabile arter.<sup>13</sup>

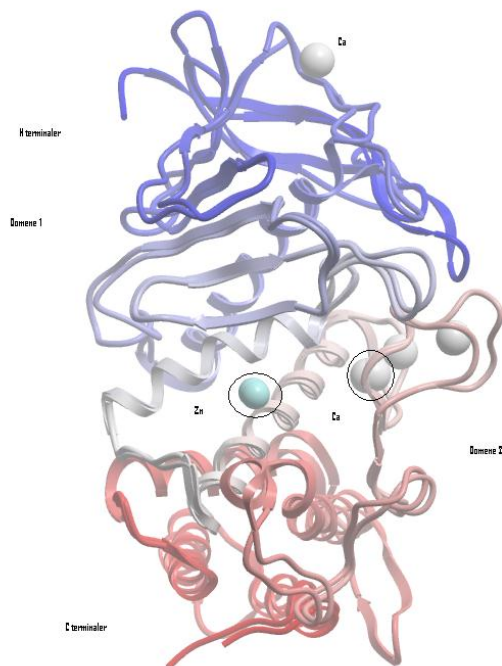


**Figur 2.** C $\alpha$  karbonkjeden til TLN (PDB kode: 1TLN). Figuren viser Zn-ionet (blått) på aktivt sete mellom de to domenene og de fire Ca-ionene (grått). Blå fargen viser domene 1 og N-terminal området, mens rød fargen viser domene 2 og området nært C-terminal. Figuren viser  $\alpha$ -helikser,  $\beta$ -"sheet" og  $\beta$ -"turn".

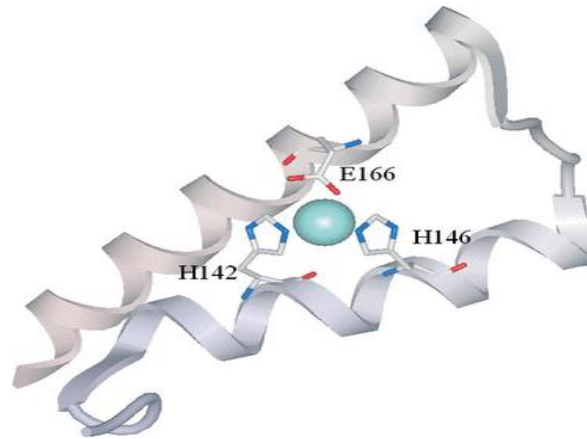




**Figur 3.** C $\alpha$  karbonkjeden til PsE. (PDB code:1EZM). Figuren viser Zn-ionet (blått) på det aktive setet mellom to de domenene samt Ca-ionet (grått). Blå fargen viser domene 1 og N-terminal området, mens rød fargen indikerer domene 2 og området nært C-terminalen. Figuren viser  $\alpha$ -helikser,  $\beta$ -"sheet" og  $\beta$ -"turn". De to disulfidbruene i strukturen er ikke vist på figuren.



**Figur 4.** Figur viser TLN og PsE plassert oppå hverandre. Figuren viser klare strukturelle likhetstrekk mellom enzymene, spesielt i aktiv sete region. Zn - ionene (blå farge, omringet her) er nesten helt likt plassert i de to enzymene. Kalsium ionet i PsE (grå farge omringet) har samme posisjon som et av de fire kalsiumionene i TLN.



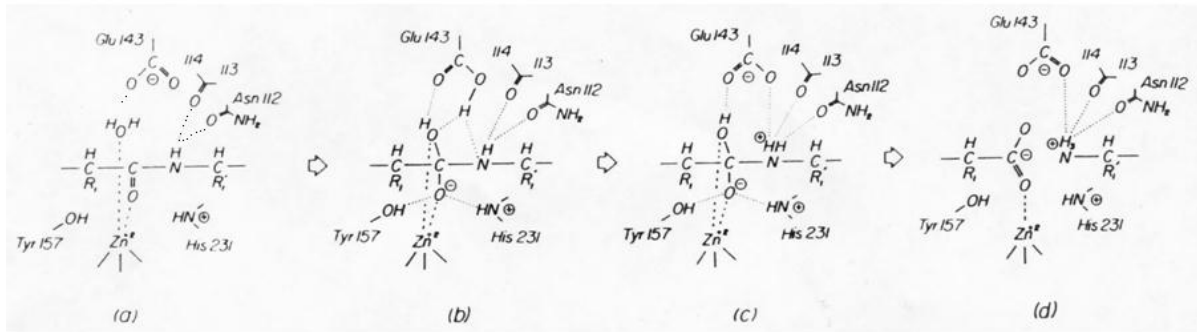
**Figur 5.** TLN aktiv sete. Zinc-ionet og koordinerende aminosyrer er vist på figuren. Figuren er modifisert fra referanse 21.<sup>21</sup>

### 1.1.7. Katalytisk mekanisme til Thermolysin og Pseudolysin

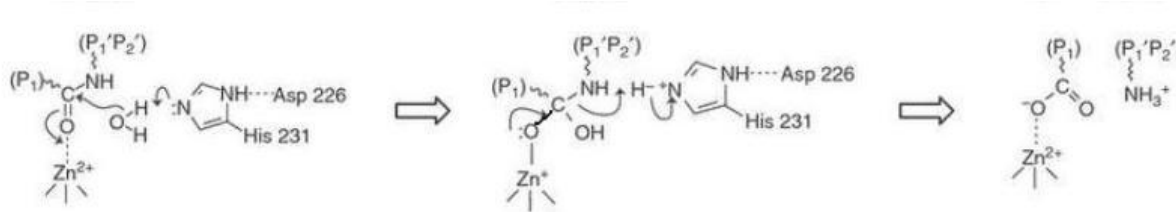
Katalytisk mekanismen til TLN er best karlagt. TLN er regnet som en typisk representant for hele M4 familien, men det er fremdeles detaljer som ikke er helt forstått.<sup>21</sup>

Metalloproteaser i klan MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO, og MP trenger bare et katalytisk metall ion, mens metalloproteaser fra klan r MF, MG, MH, MN, og MQ inneholder to katalytiske metall ioner. Katalytisk mekanisme til Met-Zincins enzymer er lite karlagt sammenlignet med Glu-Zincins enzymer.<sup>13</sup> Katalytiske mekanisme til TLN som er et Glu-Zincins enzym er vist på Figur 5 og 6.

Zn<sup>2+</sup>-ionet er nødvendig for enzymets katalytiske aktivitet. Fjerning av Zn<sup>2+</sup> eller å erstatte det med andre metallioner resulterte i minsket katalytisk aktivitet eller i et inaktivt enzym. Overskudd av Zn<sup>2+</sup> ioner hemmet TLN. I krystallstrukturer av metall-substituerte TLN derevater kunnet man observere konformasjonsforandringer i aktiv sete region.<sup>30</sup>



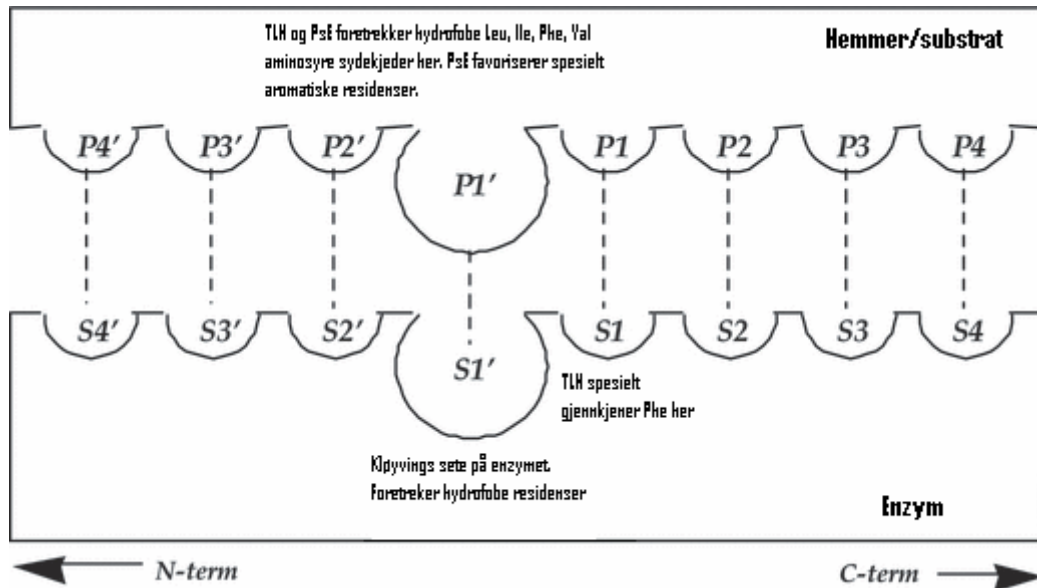
**Figur 6.** Figurener er modifisert fra Matthewset al. 1987<sup>31</sup>. Første foreslåtte katalytisk mekanisme for TLN basert på polarisering av Zn-bundet vann molekylet med Glu 143 residien ved HEXXH motivet (a) og videre etterfølgende nukleofilt angrep på karbonyl karbonatomet som spaltes av. Protonert His 231 stabiliserer "transition state" via dannelse av hydrogen binding til karbonyl oksygenatomet (b). Spalting av tetrahedralt intermediate skjer på grunn av protonering av amid nitrogen (c) ved bindingen som spaltes (d).<sup>13, 32</sup>



**Figur 7.** Figuren er modifisert fra referanse 21.<sup>21</sup> En alternativ mekanisme "reverse protonation" ble foreslått basert på observasjoner av at katalytisk konstant var pH avhengig ved hydrolyse.<sup>33,34</sup> Mekanisemen foreslår at His 231 ved aktiv sete har en viktig funksjon. Det ble foreslått at bindingen som spaltes ble aktivert for hydrolyse via direkte koordinering av karbonyl oksygenatom til Zn-ionet og samtidig erstatning av vannmolekylet som er bundet til Zn-ionet. His 231 sammen med Asp 226 bidrar til protonoverføringer via deprotonering av vann molekylet som ikke bindes til Zn ionet ved denne foreslåtte mekanisemen.<sup>13</sup>

Kjemiske studier viste etter hvert betydningen av Glu 143 i TLN katalysert hydrolyse av peptider. Studier viste at en revers protonerings mekanisme (Figur 7) er mindre favorisert enn mekanisemen i Figur 6. En av grunnene til det, er at Glu 143 finnes i alle metalloproteaser som har HEXXH motiv, mens His 231 finnes bare i en del metalloproteinaser.<sup>35</sup> I tillegg styrkes påstanden om en viktig rolle for Glu 143 av sete-dirigert mutagenese. Mutagenese av Glu 143 til Ala, Ser, Trp eller Arg førte til nedsatt eller tap av katalytisk aktivitet.<sup>36-38</sup> Dette støtter den første foreslåtte katalyse mekanisemen (Figur 6) av Hangauer og kolleger.<sup>32</sup>

TLN og TLPs foretrekker å kløyve substrater som har store hydrofobiske residier (Leu, Phe, Val, Ile) ved P1' posisjon og små aminosyrer i posisjon P1. Nomenklatur etter Schechter og Berger, 1967.<sup>39</sup> Fire store substrat bindingslommer (S2, S1, S1', S2') på enzymets overflate ble identifisert (Figur 8)<sup>32</sup>. Forsøk på å gjøre S1' lommen større ved å erstatte Leu 202 på TLN sin overflate med mindre aminosyrer (Val, Ala, Gly) førte til større affinitet for Phe i posisjon P1'. Interessant i dette tilfellet er at ved forsøk på å gjøre S1' lommen mindre ved å erstatte Leu 202 på TLN overflate med større aminosyrer enn Leu (Phe, Tyr) så økte TLN aktivitet for substrater med Phe i P1' posisjon.<sup>40</sup>

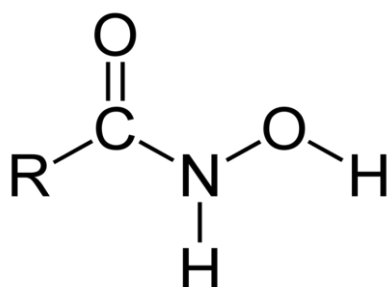


**Figur 8.** Skjematiske bilde for spesifisiteten mellom sub-seter på TLPs aktive sete og binding sete til en hemmer eller kløyvingssete til et substrat.<sup>21, 39-42</sup> Figuren er modifisert fra referanse 21.

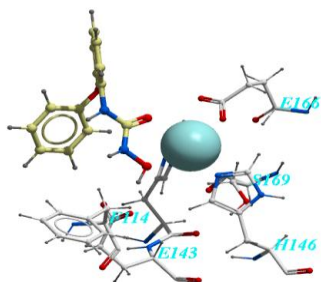
Mange studier de siste 20-årene har vist at TLN aktivitet ble forandret ved forskjellige sete spesifikke mutasjoner av aminosyrer i bindingslommen.<sup>37, 42-45</sup> Det ble blant annet observert at effekten av mutasjoner på aktivitet var liten for store peptidsubstrater i motsetning til hva som ble observert for små peptider, muligens som en konsekvens av forskjell i mulige produktive bindingsmoduser for substrater.<sup>13</sup>

### 1.1.8. Chelaterende forbindelser

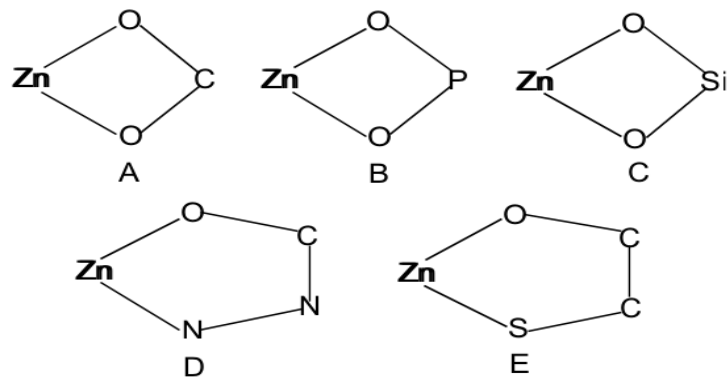
Metallopeptidaser hemmes av Zn-chelaterende forbindelser. Eksempel på slike forbindelser er 1,10-phenanthroline, EDTA, og Galardin. Noen eksempler på chelaterende grupper er vist i Figur 10. Galardin  $K_i=20$  nM (også mange forbindelser i tabell 3 og 4) inneholder en hydroksammat syredel (Figur 9) som binder seg sterk til Zn-ionet. Galardin er den mest potente hydroksammat type hemmersom er rapportert for PsE og TLN.<sup>46</sup> Mange andre TLN hemmere er stadig under utvikling.<sup>47,48</sup>



**Figur 9.** Figuren er modifisert fra referanse 49.<sup>49</sup> Strukturen til hydroksammat syre med formelen R-CO-NH-OH. Slike forbindelser brukes som metall-”chelator” i industrien. Oksygenatomene binder til Zn og danner en pentaring. Hydroxymat syre er også en viktig vekst faktor og vitamin kilde for enkelte mikroorganismer i naturen i sammenheng med binding av jern.<sup>50,51</sup>



**Figur 10.** Figuren viser eksempel på hydroksammat binding av forbindelsen BF249 (fra tabell 3, figur 21) basert på dokking med ICM programmet. De to hydroksammat oksygenatomene danner bindinger med Zn på en ”bidentate” måte.<sup>52</sup>



**Figur 11.** Eksempler på geometri av noen andre chelaterende forbindelser som binder Zinc. Figuren er fra referanse 53<sup>53</sup>. (A) Bindingsposisjon for karboksylat gruppe bundet til Zinc. (B) Bindingsposisjon av fosfat oksygener. (C) Bindingsposisjon av silanediol gruppe. (D) og (E) Bindingsposisjon av OCNN gruppe og OCCS gruppe.. Begge disse gruppene danner pentaringer ved å binde til Zn atomet.<sup>53</sup>

## 1.2. Enzymkinetikk

### 1.2.1. Michaelis Menten kinetikk

Kunnskap om enzym kinetikk hjelper oss til å forstå mekanismer til en enzymkatalysert reaksjon og hvordan forandringer i eksperimentelle parametere (konsentrasjoner, pH, temperatur også lignende) kan forandre hastighet av en enzymkatalysert reaksjon.<sup>4</sup>

På enzymets aktiv sete er alle funksjonelle grupper arrangert optimalt for å danne svake interaksjoner med aktuelt substrat ved transition tilstand. Enzymet vil ikke være i stand til å danne like mange optimale interaksjoner med andre molekyler enn de som har en struktur som ligner substratet. Så enzymene er veldig spesifikke. Molekylære interaksjoner holder substrat molekylet i et riktig posisjon på aktiv sete, en optimal posisjon for katalytisk reaksjon. Optimal interaksjon mellom enzym og substrat skjer bare ved transition state.<sup>4</sup>

Enzym substrat komplekset (ES) er hovedfaktor for å forstå en kinetisk tendens. Et enzym eksisterer i to former i enzymet katalysert reaksjon, en fri (E) og en bundet i et ES kompleks. Enzymet vil først bindes reversibelt til substratet og det dannes et ES kompleks. Dette er en meget rask prosess som foregår i et tidsrom mellom noen mikrosekunder til en millisekund. Typen av kinetikk som brukes for å studere binding av substrat til enzym kalles pre-steady state kinetikk. Etter dannelsen av ES kompleks så vil en kjemisk reaksjon foregå der substrat spaltes til produkt (ligning 1) og dette er en lansom reaksjon som foregår i tidsrommet sekunder til timer avhengig av enzym. I dette tidsrommet så er det et et tilnærmet konstant forhold mellom

fritt enzym E og enzym-substrat kompleks (ES), d.v.s et "steady-state" tilstand. Den type kinetikk som måler produkt produsert i denne tidsperioden kalles "steady-state" kinetikk. En betingelse for å kunne måle "steady-state" kinetikk er at substratkonsentrasjon er mye større en enzymkonsentrasjon ( $[S] \gg [E]$ ). Nedbrytingen av ES komplekset kan skje i flere reaksjonsteg avhengig av både substrat og enzym type.



Hvert reaksjonstrinn har sin egen hastighetskonstant:

$k_1$  er hastighetskonstanten for dannelse av enzym-substrat (ES) komplekset  $E + S \rightarrow ES$

$k_{-1}$  er hastighet konstanten for spalting av ES komplekset  $ES \rightarrow E+S$

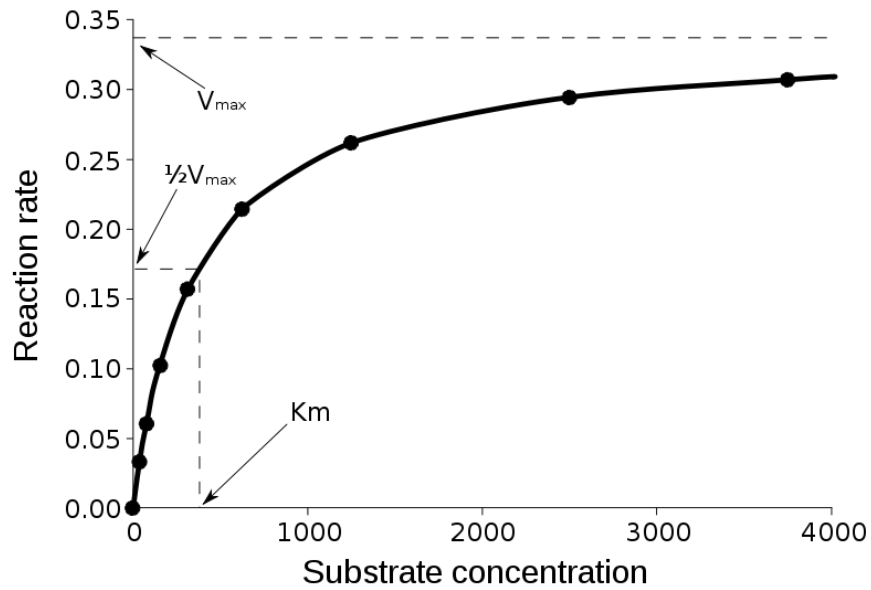
$k_2$  er hastighet konstanten for spalting av ES komplekset til enzym + produkt

Ved steady state:  $k_1 = k_{-1} + k_2$ , det vil si at hastigheten for kompleks dannelse er lik hastigheten for spalting av komplekset.

Når "steady state" kinetikk benyttes for å måle en enzymatisk reaksjon så måles enten mengde produkt produsert per tidsenhet ( $\Delta P/\Delta t$ ) eller mengde substrat forbrukt per tidsenhet ( $\Delta S/\Delta t$ ). Den målte reaksjonshastigheten  $V_0$ , kalles "initial rate" (initialhastighet) da den kun tar utgangspunkt i den lineare delen av hastighetskurven nær tidspunkt null.

Reaksjonshastigheten til et enzym varierer med substratkonsentrasjonen, og for de fleste enzymer så vil en kurve  $V_0$  mot  $[S]$  være hyperbolsik slik som vist i figur 12. En slik kurve kan beskrives med Michelis-Menten (MM) ligningen (2). MM ligningen er en hastighets ligning for en enzym katalysert en-substrat reaksjon:<sup>4</sup>

$$V_0 = ( V_{max} [S] ) / ( K_m + [S] ) \quad (2)$$



**Figur 12.** Figuren viser en Michaelis-Menten kurve hvor reaksjonshastigheten er plottet som funksjon av substrat konsentrasjonen.  $K_m$  (Michaelis Menten konstant) tilsvarer substrat konsentrasjon når 50 % av alt enzym i løsninger foreligger i ES komplekset og reaksjonshastigheten er lik  $\frac{1}{2} V_{max}$ . Figuren er hentet fra referanse 54.<sup>54</sup>

Ved lave substrat konsentrasjoner er nesten alt enzymet i ubundet form. Da er reaksjonshastighet proporsjonalt til substrat konsentrasjonen og kurven er nesten lineær. Reaksjonshastigheten vil øke med økende substrat konsentrasjon (mer substrat  $\rightarrow$  mer ES  $\rightarrow$  mindre fritt E). Ved lave  $[S]$  (når  $K_m \gg [S]$ ) kan MM ligning omformes til ligning 3:

$$V_0 = (V_{max} / K_m) \cdot [S] \quad (3)$$

Den kinetiske koeffisienten  $V_m/K_m$  representerer derfor enzymets reaksjonshastighet ved lav substratkonsentrasjon, og benyttes som man skal se på et enzyms subtratspesifisitet.

Ved økning i  $[S]$  dannes det proporsjonalt mer og mer ES kompleks inntil alt enzym bindes til substrat. Ved uendelig høy  $[S]$  (når  $[S] \gg K_m$ ) vil alt enzym foreligge som et enzym-substrat (ES) kompleks. Reksjonen har nå nått et maskimum og kan ikke gå raskere og  $V_0 = V_{max}$ . Dette er enzymets maksimale reaksjonshastighet,  $V_{max}$ . Den kinetiske koeffisienten  $V_{max}$  reflekterer hvor raskt et enzym bryter et substrat til produkt.



Når enzymatiske reaksjoner involverer flere trinn i prosessen (ligning 4) og dermed flere hastighetskonstanter



$k_1$ - er hastighetskonstanten for dannelse av enzym-substrat (ES) komplekset  $E + S \rightarrow ES$

$k_{-1}$  – er hastighet konstanten for spalting av ES komplekset  $ES \rightarrow E+S$

$k_2$  – er hastighet konstanten for danelse av enzym-produkt (EP) komplekset  $ES \rightarrow EP$

$k_3$  – hastighetskonstanten for spalting av EP komplekset  $EP \rightarrow E+P$

er det vanligere å bruke en mer generalisert hastighetskonstant for enzymatiske reaksjoner som  $k_{cat}$ . Når all enzym foreligger enten i ES eller i EP komplekser, eller med andre ord når en enzymatisk reaksjon har flere trinn og et av trinene er klart hastighetsbegrensende, så er  $k_{cat}$  er ekvivalent med hastighetskonstanten til det hastighetsbegrensende trinnet.  $k_{cat}$  er første orden hastighet konstant og har enhet av  $t^{-1}$  (resiprokal tid), som er ekvivalent til antall substrat molekyler som ble omdannet til produkt i løpet av et tidsintervall når enzymet er mettet med substrat. To enzymer som katalyserer forskjellige reaksjoner kan ha samme  $k_{cat}$ .<sup>4</sup>

Til forskjell fra  $K_m$  så varierer  $V_{max}$  med  $[E]$  og ligning 5 viser denne relasjonen.

$$V_{max} = k_{cat} \cdot [E] \quad (5)$$

Hvis vi kjenner  $[E]$  kan vi finne  $k_{cat}$  for et bestemt substrat ved hjelp av ligning 6:

$$k_{cat} = V_{max} / [E] \quad (6)$$

Nå kan vi skrive MM ligning med hensyn til  $k_{cat}$  (ligning 7):

$$V_0 = ( k_{cat} \cdot [E] \cdot [S] ) / ( K_m + [S] ) \quad (7)$$

$K_m$  er den substratkonsentrasjon som gir en reaksjonshastighet  $V_0$  som er lik  $V_m/2$ . Hvis vi tar utgangspunkt i ligning (1) så vil  $K_m$  kunne beskrives av de tre hastighetskonstantene slik som beskrevet i ligning (8).

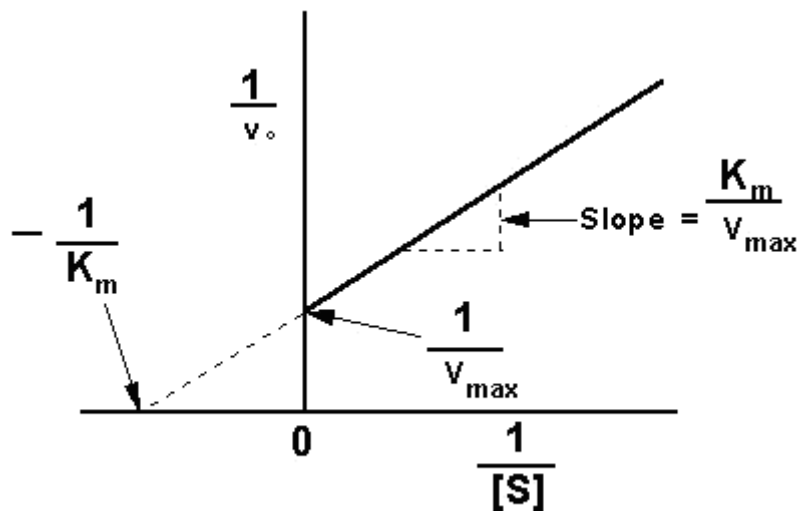
$$K_m = (k_2 + k_{-1}) / k_1 \quad (8)$$

$K_m$  og  $k_{cat}$  verdier er forskjellige fra enzym til enzym.  $K_m$  og  $k_{cat}$  varierer også for forskjellige substrater for det samme enzymet. Begge verdiene kan bestemmes eksperimentelt, men begge gir liten informasjon om

antall, hastighet og kjemisk karakter av hvert enkelt trinn i en enzymatisk reaksjon.  $K_m$  er noen ganger brukt som en indikator på affinitet av et enzym til dets substrat, ved tilfellet når  $k_2 \ll k_{-1}$ , se ligning (8).<sup>4</sup>

### 1.2.2. Lineweaver-Burk kinetikk

For å bestemme verdien til de kinetiske koeffisientene  $V_m$ ,  $K_m$  og  $V_m/K_m$  bruker man vanligvis en såkalt dobbelt resipokal kurve (Figur 13). Lineweaver-Burk ligningen (LB ligning (9)) er en algebraisk transformasjon av MM ligningen. Det blir tatt resipokal av begge sider av MM ligning.



**Figur 13.** Figur viser en dobbelt resipokal Lineweaver-Burk kurve. Kurven gir mulighet til å beregne flere kinetiske parametere. Der hvor linjen krysser y-aksen får vi  $V_{max}$ . Stigningstallet til linjen gir  $K_m/V_{max}$ . Linjen krysser x-akse i punktet som tilsvarer negativ verdi for resipokal  $K_m$ . Figuren er hentet fra referanse 55.<sup>55</sup>

Lineweaver-Burk ligning:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (9)$$

Vi plotter  $1/V_0$  som funksjon av  $1/[S]$ . Grafen blir en rett linje som krysser Y akse ( $1/V_0$  akse).

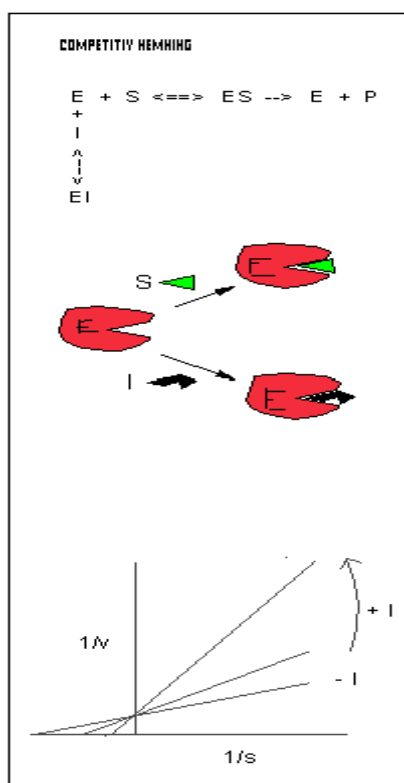
$1/V_{max}$  er krysnings punkt med Y akse (intercept) og slope til grafen er  $K_m/V_{max}$ .

LB plot er veldig mye brukt ved beregninger av  $V_{max}$  og  $K_m$  verdier, samt for å skille mellom forskjellige typer enzymatiske reaksjonsmekanismer og ved analyser av enzym hemning.<sup>4</sup>

### 1.2.3. Kompetitiv hemning

Enzymets aktivitet kan hemmes av kjemiske forbindelser via forskjellige mekanismer. En hemmer er et molekyl som interferer med katalytiske reaksjoner og forsinker eller stopper reaksjonen helt. Det finnes reversible og irreversible hemmere. Tre typer av reversibel hemming er: kompetitiv (Figur 14), unkompetitiv (Figur 16) og miksed hemning (Figur 18).

Irreversible hemmere binder kovalent til enzymet. Enzymet er ikke i normal funksjon etter en slik binding, og man sier at slike hemmere leder til enzymets død.



**Figur 14.** Illustrasjon av kompetitiv hemming. EI: Enzym – hemmer kompleks. Se forklaring til figuren i teksten. Figuren ermodifisert fra referanse 56.<sup>56</sup>

Ved kompetitiv hemming konkurrerer hemmeren med substratet om det aktive setet på enzymet (Figur 14). Det dannes et EI kompleks hvis hemmeren binder reversibelt til enzymets aktive sete. Kompetitiv hemming kan analyseres eksperimentelt med "steady state" kinetikk. MM ligning vil se slik ut ved kompetitiv hemming:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{\alpha K_m + [S]} \quad (10)$$

$\alpha K_m$  er  $K_m$  som bestemmes eksperimentelt ved tilstedeværelse av en hemmer (kalt apparent  $K_m$ )

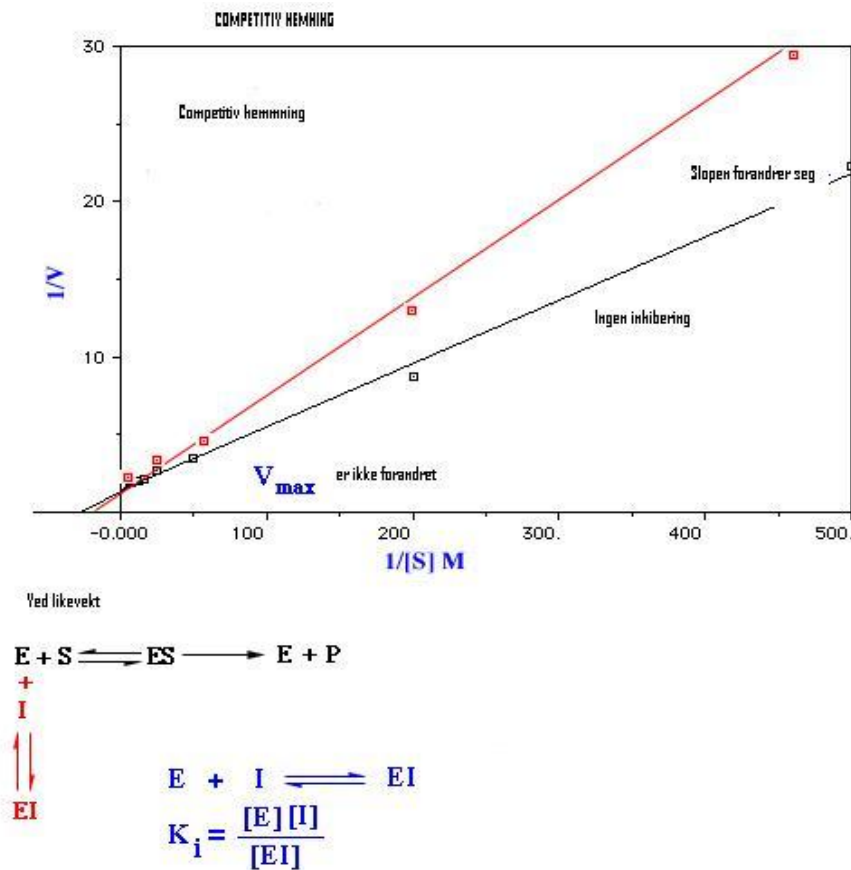
$$\alpha = 1 + [I]/K_i \quad K_i = ([E] \cdot [I]) / [EI] \quad (11)$$

$K_i$  er likevekt dissiasjon konstanten for hemmer binding.

På grunn av at hemmingen er reversibel kan den oppheves ved å øke substrat konsentrasjonen.

$K_m$  øker ved tilstedeværelse av et hemmer med faktor  $\alpha$ . Denne effekten på  $K_m$  kombinert med fravær av effekt på  $V_{max}$  er kjennetegn for kompetitiv hemming og relevant når vi observerer en dobbelt reciprocal kurve, og  $K_i$  verdi kan bergnes fra kurven.<sup>4</sup> Dobbelt reciprocal kurve er en enkelt måte å vise når hemmingen er kompetitiv, unkompetitiv eller mixed.

Hvis konsentrasjon av enzymet holdes konstant, mens konsentrasjonen av hemmeren øker og  $1/V_0$  plotes som funksjon av  $1/[S]$  blir :



**Figur 15.** Grafen for kompetitiv hemming ved økende konsentrasjon av hemmer viser en serie av rette linjer som har samme skjæringspunkt ( $1/V_{max}$ ) på Y aksten, men med forskjellige "slope" (stigning). Vi vet at  $V_{max}$  er uforandret ved kompetitiv hemming.

Figuren er modifisert fra referanse 55.<sup>55</sup>

$$1/V_o = (\alpha K_m/V_{max})/(1/[S]) + 1/V_{max} \quad (12)$$

$$\text{"Slope"} = \alpha K_m/V_{max} \quad (13)$$

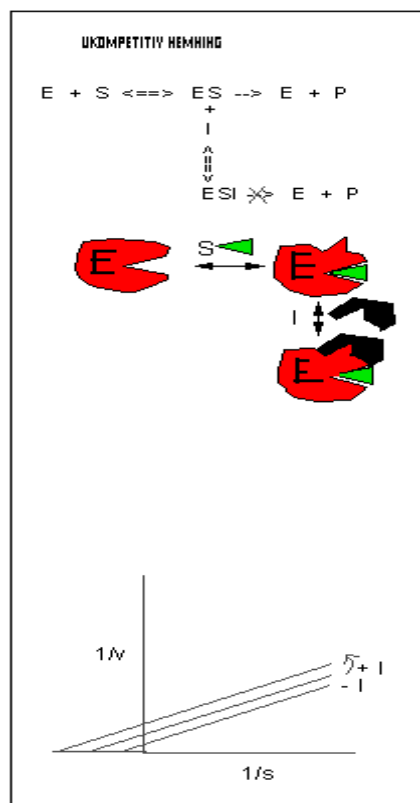
$\alpha$  – kan beregnes fra forandring i slope ved enhver hemmer konsentrasjon

Når vi vet  $[I]$  og faktor  $\alpha$ , kan vi beregne  $K_i$  verdi ved hjelp av følgende ligning (10)

$$\alpha = 1 + [I]/K_i \quad (14)$$

#### 1.2.4. Unkompetitiv hemming.

Ukompetitiv hemming oppstår når hemmer binder til et "allosteriske" sete på enzymet, etter at substrat har bundet seg til enzymets aktive sete. Det betyr at unkompetitive hemmere binder seg til ES komplekset (Figur 16).



Figur 16. Illustrasjon på unkompetitiv hemming. ESI- enzym-substrat-hemmer kompleks. Figuren er modifisert fra referanse 56. <sup>56</sup>

MM ligninga for unkompetitiv hemming er som følger:

$$V_o = (V_{\max} \cdot [S]) / (K_m + \alpha' [S]) \quad (15)$$

Hvor  $\alpha' = 1 + ([I]/K_i')$  og  $K_i' = ([ES] \cdot [I]) / [ESI]$

Dobbel reciprocal kurve viser en serie av parallelle linjer som har samme stigning, men krysser Y-aksen på forskjellige punkter (Figur 17).

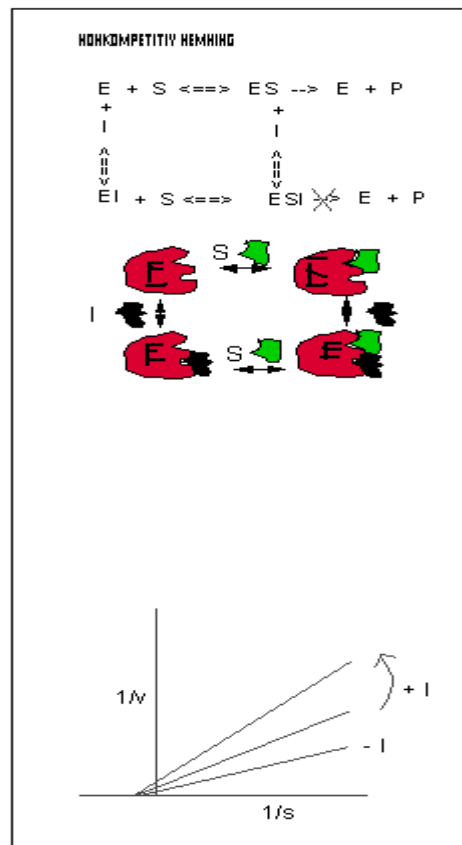


**Figur 17.** Figuren viser en Lineweaver-Burk av unkompetitiv hemming. En serie av rette linier som hver representerer en hemmer konsentrasjoner får ikke samme skjærings punkt på Y-akse. Figuren er modifisert fra referanse 57. <sup>57</sup>

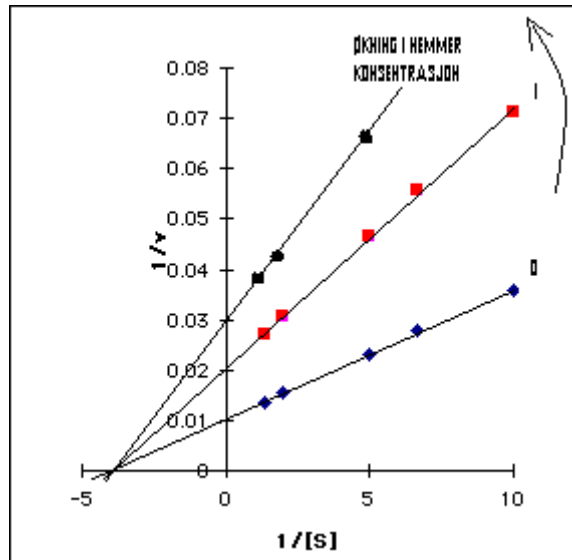
$$1/V_o = (K_m/V_{\max}) \cdot (1/[S] + \alpha'/V_{\max}) \quad (16)$$

### 1.2.5 Miksed hemning

Miksed hemming er en type hemming hvor hemmer binder både til fritt enzym eller enzym-substrat kompleks. Ved denne type hemming kan både substrat og hemmer molekylet bindes til enzymet på samme tid. Når det dannes enzym-substrat-hemmer kompleks er dannelsen av produktet ikke mulig og reaksjon kan gå i revers retning til gjendannelse av enten enzym-substrat kompleks eller enzym-hemmer kompleks.<sup>4</sup> (Figur 18)

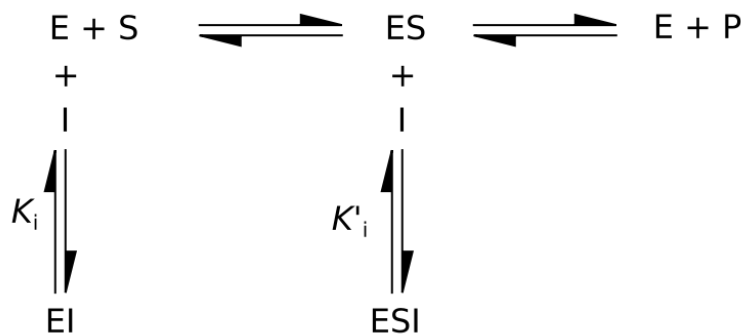


**Figur 18.** Figuren viser non-kompetitiv hemming. En spesiell variant av miksed hemming. Binding av hemmer hindrer ikke binding av substrat. Figuren er modifisert fra referanse 56.<sup>56</sup>



**Figuren 19.** En dobbelt reciprokalt plott av nonkompetitiv hemming. Plottet er veldig likt plottet for kompetitiv hemming, bortsett fra at linjene som er dannet av forandring i hemmer konsentrasjoner krysser ikke y-aksen i et skjæringspunkt, mens krysser hverandre i et punkt på x-aksen. Figuren er modifisert fra referanse 58.<sup>58</sup>

Forskjell mellom miksed og non-kompetitiv hemninger ligger i hvor bak y-aksen linjene krysser hverandre. Dette avhenger av hvor sterkt inhibitor binder til E respektive ES.



**Figur 20.** Figuren modifisert fra referanse<sup>59</sup>. Figuren viser skjematisk ligninger for miksed inhibering der inhibitor (I) kan binde både til fritt enzym (E) og til enzym-substrat (ES) komplekset.  $K_i$  er dissosiasjonskonstanten for enzym-hemmer (EI) komplekset og  $K'_i$  er dissosiasjonskonstanten for enzym-substrat-hemmer (ESI) komplekset.

Når  $K_i = K'_i$  får vi en nonkompetitiv inhibering og da krysser linjene seg som vist på figuren 19.

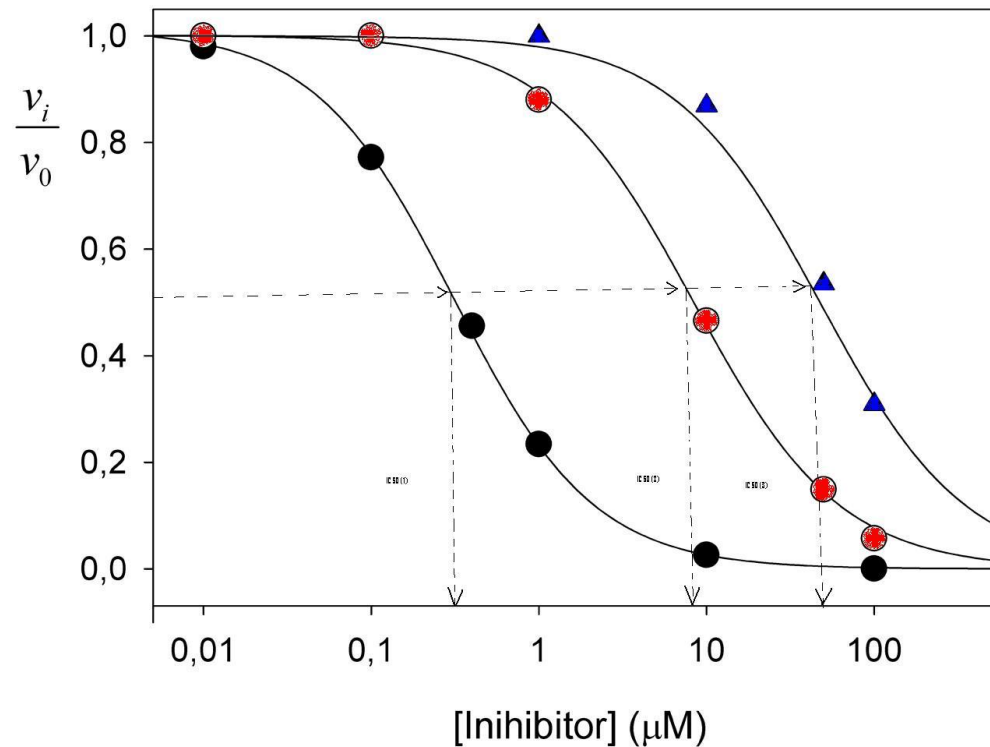
Når  $K_i > K'_i$  krysser linjene i tredje kvadrant, d.v.s. under negativ side på x-akse. Når  $K_i < K'_i$  krysser linjene i den andre kvadrant, d.v.s. over negativ side på x-akse. Hvor nært og hvor høyt i området linjene krysser er avhengig av den relative styrken til EI og ESI kompleksene.



### 1.3. Generelt om hemmere

#### 1.3.1. Dose-respons kurve

Identifisering og kartlegging av hemmere kan gjøres via målinger av dose-respons kurver for inhibering (Figur 21).<sup>60</sup> Da måles et spesifikt signal som en funksjon av hemmer konsentrasjonen. Med andre ord en funksjon som relaterer forandringer i signal til forandringer i hemmer konsentrasjoner. Dette kalles en dose-respons kurve. For å bestemme effekten av en hemmer på enzymets aktivitet kan en dose-respons kurve plottes ved at man følger effekten av en hemmer på initial hastighet ( $V_0$ ) av en enzymatisk reaksjon ved konstant konsentrasjon av substratet.<sup>61</sup>



**Figur 21.** Figuren er modifisert fra referanse 62.<sup>62</sup> Figuren viser dose-respons kurve for tre forskjellige hypotetiske hemmer forbindelser. Se forklaring i teksten over og under figuren. X-aksen = logaritmen av hemmer konsentrasjoner (5 og flere konsentrasjoner) . Y-aksen = forholdet mellom hemmet ( $V_i$ ) og uhemmet ( $V_0$ ) enzym aktivitet.

For å kunne lage en dose-respons kurve er det viktig å bruke substrat konsentrasjoner som er mindre en enzymets  $K_m$  verdi, hvis hemmeren konkurrerer med substratet om aktivt sete.<sup>63</sup> Hvor langt ned i

substratkonsentrasjonen man skal gå er avhengig av hva som gir en praktisk målbar og herved brukbar enzymaktivitet. Disse parametrene bestemmes eksperimentelt på forhånd, før eksperimentene med hemmer starter. Det er viktig å kjenne de kinetiske koeffisientene for enzymet med det substrat som skal brukes i inhiberingsforsøkene. Det kan også være en fordel å kjenne enzymets reaksjonsmekanismer med det substrat som skal brukes.

### 1.3.2. IC<sub>50</sub> og K<sub>i</sub> betydning og beregninger

Konsentrasjon av hemmer som kreves for å få 50 % reduksjon i enzymatisk aktivitet kalles IC<sub>50</sub> verdi. Ligning (17) beskriver relasjonen mellom enzymets reaksjonshastighet med (V<sub>i</sub>) og uten (V<sub>o</sub>) hemmer (I) og bindingskonstanten IC<sub>50</sub>:

$$V_i/V_o = 1 / (1 + ([I] / IC_{50})) \quad V_i/V_o \text{ går ned når } [I] \text{ går opp} \quad (17)$$

Ved å lage dose-respons kurver (V<sub>i</sub>/V<sub>o</sub> mot [I]) slik som i (figur 21) kan IC<sub>50</sub> verdi for en hemmer bestemmes.<sup>61</sup>

For hemmere som binder enten svakt eller sterkt til enzymet så er enzymets IC<sub>50</sub> verdi avhengig av substratkonsentrasjonen som beskrevet nedenfor. For sterke, tett bindende hemmere, avhenger IC<sub>50</sub> verdi både av enzym og substrat konsentrasjoner. Desto høyere substrat og/eller enzym konsentrasjoner, desto høyere vil IC<sub>50</sub> verdien bli, på grunn av det kreves høyere konsentrasjoner av hemmer for å okkupere 50 % av bindingsetene (50 % reduksjon i aktivitet) når enzymkonsentrasjonen er høy. Desto lavere K<sub>i</sub> eller IC<sub>50</sub> verdi, desto sterkere binder hemmer til enzym.<sup>63</sup>

Både K<sub>i</sub> (dissosiasjons konstanten for enzym-hemmer kompleks) og IC<sub>50</sub> verdi beskriver bindingsaffinitet mellom hemmer og enzym. Felles for begge er at enhetene er at de benevnes i molare konsentrasjoner, og desto mindre konsentrasjonen er desto sterkere er bindingen. Den indikerer hvor mye av et hemmer man trenger in vitro for å hemme en enzymaktivitet med 50 %. Med andre ord forteller oss K<sub>i</sub> og IC<sub>50</sub> verdiene hvor potent en hemmer er mot et enzym.

K<sub>i</sub> er mest brukt for å beskrive effektivitet av en hemmer, fordi i motsetning til IC<sub>50</sub> verdi er K<sub>i</sub> uavhengig av substratkonsentrasjonen.

For reversible hemmere gjelder antagelsen om at siden enzym konsentrasjonen er mye lavere enn  $K_i$  verdien, vil konsentrasjonen av enzym-hemmer komplekset være veldig lav i forhold til konsentrasjon av hemmer. Denne antagelse passer ikke for alle typer hemmere.

Enkelte hemmere bindes til sine enzymer med høyt affinitet og sterkere (tettere) enn andre slik at antall frie molekyler av hemmeren blir sterk redusert ved å danne mange enzym-hemmer komplekser (EI)<sup>61</sup>. For slike tett bindende hemmere vil tradisjonelle steady-state verdier ikke være pålitelige og deres virkning på enzymet begrenses av en langsom start av inhiberingsprosessen, som er en tidsavhengig komponent av inhiberingen. Konsentrasjon av enzymet bør være mye mindre enn hemmer konsentrasjon.<sup>64</sup>

Mange sterke hemmere trenger tid for å binde seg skikkelig til enzymet og påvirke enzymets aktivitet. En sterk hemmer vil trenge lave konsentrasjoner for å hemme enzymets aktivitet med 50 %, men selv om man har med sterke hemmere å gjøre kan hemmeren trenge lang tid for å binde seg til enzymets aktive sete å gi sterk hemming. Derfor bør enzymene preinkuberes med hemmere.<sup>61</sup> Nødvendig preinkuberingstid og eventuelt temperatur kan bestemmes eksperimentelt. Når IC<sub>50</sub> verdier skal bestemmes for et stort antall hemmere er det en fordel å bruke en plateleser for 96 brønners brett, for da flere hemmere og hemmerkonsentrasjoners effekt på enzymet måles samtidig og dermed spares mye tid.

Cheng-Prusoff ligningene (18-19) beskriver relasjonen mellom  $K_i$  verdi, IC<sub>50</sub> verdi, substratkonsentrasjon ([S]) og  $K_m$  verdi for substrat:<sup>53</sup>

$$IC_{50} = K_i \cdot (1 + ([S]/K_m)) \quad (18)$$

$$K_i = IC_{50} / (1 + ([S]/K_m)) \quad (19)$$

For å kartlegge type av inhibering kan klassisk dobbel-reciprokal plott benyttes. Men hvis vi har med en veldig sterk bindende forbindelse å gjøre, d.v.s.  $K_i$  verdi er av samme størrelseorden som den brukte enzymkonsentrasjonen i reaksjonsblandningen, må andre metoder benyttes. Flere grafiske metoder ble utviklet til dette formålet.<sup>61,60</sup>

#### 1.4. Ultrafiolett (UV) spektrofotometri

Kvantitative analyser og identifikasjoner basert på UV-spektroskopi benyttes mye i farmakologiske, biologiske og mange andre typer av studier. Dette gjøres ved blant annet råvare- og preparat-kontroll ved produksjon av legemidler, samt ved bestemmelse av konsentrasjoner av et stoff i løsning på grunn av metoden er relativt rask og presis.

Mange stoffer kan absorbere lys, eller stoffer kan syntetiseres og modifiseres slik at de absorberer lys. Lys, både synlig og ultrafiolett, er elektromagnetisk stråling som kan beskrives med bølgelengde og frekvens.

UV-spektrofotometri måler absorpsjon av elektromagnetisk stråling for et stoff ved en gitt bølgelengde. Ultrafiolett bølgelengdeområdet ligger mellom 180-400 nm. Bølgelengdeområdet som sendes ut mot stoffet skal være så liten som mulig, slik at strålingen bli tilnærmet monokromatisk (stråling med bare en bølgelengde).<sup>65</sup>

Spektrofotometeret har et optisk system som er i stand til å selekere den aktuelle bølgelengde og produsere monokromatisk stråling, men i praksis vil strålingen være polykromatisk i et veldig smalt bølgelengdeområde. Strålingskilden sender ut UV-stråling mot prøven, det velges et bølgelengdeområdet man ønsker å bestråle prøven med, og detektoren registrerer intensiteten av stråling som passerer prøveløsningen (I). Intensiteten av lys som sendes fra lyskilden ( $I_0$ ) sammenlignes med lysintensitet som passerer prøveløsning (I) og informasjonen omdannes i spektrofotometeret av et elektronisk system til absorbanseenheter ( $\log I_0/I$ ) (ligning 18). Det er det man ser på skjermen til en spektrofotometer.<sup>65</sup>

Absorpsjon av synlig eller ultrafiolett lys gjør at elektronene blir "sparket" ut fra sine baner til et høyere energinivå rundt atomkjernen. Partikler som overfører lysenergi kalles fotoner. Energien i fotonene bringer et molekyl/ion M til en mer energirik form  $M^*$  (ligning 20), men absorpsjon vil bare skje hvis energien i et foton tilsvarer nøyaktig energi forskjellen mellom to energinivåer i M. Etter kort tid (millisekunder) "faller" elektronene tilbake på energinivåer som avviker lite fra de elektronene befant seg i før eksitasjonen. Den absorberte energien frigjøres nå som varme (ligning 21), mens mengde absorberte lys som blir registrert på veg ut av medium blir noe mindre (I).



$h$  – Planck's konstanten ( $6.67 \cdot 10^{-27}$  erg-sek)

$\nu$  – Frequency



Et atomet eller et molekyl kan eksistere bare ved bestemte energinivåer avhengig av orbitalene elektronene i molekylet okkuperer, avstanden mellom atomkjærnene i molekylet, og vibrasjonsenergien for elektronene. Komplekse systemer som for eksempel molekyler som består av mange atomer kan ha mange energi nivå. <sup>66</sup>

Grunnlaget for UV-spektrofotometri er Beers lov som viser proporsjonaliteten mellom absorpsjonen og konsentrasjon av stoffet i prøveløsning hvis strålingsveien holdes konstant og ved at det sendes ut monokromatisk stråling. <sup>65</sup> Det er ikke alle stoffer som følger Beers lov (ligning 22).

Beers lov:

$$A = \log I_0/I = a \cdot b \cdot c \quad (22)$$

A = absorpsjonen

a = absorptiviteten

b = lengde på lysveien (vannligvis 1 cm, bredde på kyvette)

c = konsentrasjon til analytten

Absorptiviteten er avhengig av bølglengde, løsningsmiddel, pH, og temperatur. Dermed er det viktig at disse parametrene er nøyaktig lik både for prøve og referansemedium (standard det kalibreres /refereres mot) for å unngå feil ved kvantitative bestemmelser.

Siden målt absorpsjon er proporsjonal med konsentrasjonen av substansen, og konsentrasjonen kan uttrykkes på flere måter blir benevningene på absorptiviteten (a) også forskjellig. Dersom konsentrasjon måles i % og bredde på kyvette (lysvei)tilsvarer 1 cm blir benevninger i % cm, og absorptiviteten kalles da for spesifikk absorpsjon  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ . Dersom konsentrasjon uttrykkes som M (mol/liter) og lysveien er 1 cm, blir benevningen cm M og absorptiviteten kalles da den molare absorptiviteten  $\epsilon$  ( $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ). <sup>65</sup>

Konjugerte ringsystemer, både aromatiske og heterocykliske, absorberer nært ultrafiolett region av spektrere, 200-400 nm (elektroner i  $\pi$  orbital i ringen). Eksempel på slike forbindelser er aminosyrene Tyrosine, Phenylalanin og Tryptophan. Det mest absorberende område for mange proteiner er i 280 nm region, noe som er et resultat av tilstedeværelse av disse aminosyrene. <sup>66</sup>

## 1.5. Fluorescens fotometri

På samme måte som ved spektrofotometrimålinger, blir molekylene eksitert fra en grunn tilstand til en høyere energi nivå tilstand. Men i enkelte tilfeller avgis overskuddet av energien ikke i form av varme, men i form av eksitert lys. Prosessen kalles for fluorescens. Hvis emittert lys har lavere frekvens (større bølgelengde) enn eksitert lys ( $I_0$ ) kan fluorescensen observeres og måles. Fluorescens spektrum, på samme måte som absorpsjons spektrum, er et spesifikk fingerprint for en forbindelse. Dette og at veldig små mengder av emittert stråling kan bli detektert gjør fluorescens fotometri til en sensitiv og utmerket metode for analytiske eksperimentelle studier.<sup>66</sup>

Korte lysimpulser ( $10^{-9}$  sek) sendes gjennom prøveløsningen med jevne mellomrom. Fluorescensemisjonen måles ved hjelp av detektoren etter hver impuls. Intensitet av emisjonen måles perpendikulært til innsendt lysimpuls.<sup>66</sup> Dette er forskjellig fra spektrofotometrisk målinger beskrevet tidligere, hvor lys som sliper gjennom prøveløsning ( $I$ ) måles parallelt til lyset som sendes inn ( $I_0$ ).

## 1.6. Dokking

### 1.6.1. Dokking som en del av en Virtual ligand screening prosess

Over tid har vår kunnskap om enzymer økt. For mange enzymer har vi detaljert kunnskap om hvilke veier de katalyserer i biologiske prosesser, hvordan det aktive setet er bygd opp, og ikke minst hvordan vi kan påvirke aktiviteten. Når kunnskapen økes, så vil også mer avanserte dataprogrammer komme til anvendelse. I de siste 30 årene har det vært en stor utvikling. I dag kan molekylmodellering ved hjelp av avanserte dataprogrammer brukes til å gi et strukturellt innblikk i hvordan enzymene fungerer. Datamaskin basert "screening" og strukturelle studier danner i dag basis for "design" og syntese av nye lovende hemmere. En detaljert kunnskap om hvordan katalytiske sete er bygd opp og innsikt i hvordan kjente hemmere interagerer med det aktive setet er viktig for å utvikle nye forbindelser av interesse, spesielt til klinisk terapeutisk bruk. Man kjenner 3D strukturen til mange viktige enzymer som er mulige "drug targets", noe som bidrar til økende fokus på strukturbasert "drug design".

Molekylær dokking brukes til teoretisk studie av protein-ligand interaksjoner, og bidrar til en forståelse av optimal orientering av liganden på det aktive setet.<sup>67</sup> Metoden predikerer affinitet mellom enzym og dets ligand og kan gi et strukturelt innblikk i eksperimentelle bindings konstanter. Typisk er å tilpasse et lite molekyl best mulig til en stor protein struktur.<sup>68</sup> Som tidligere nevnt, de fleste terapeutiske targets er proteiner, og de fleste ligander er lav molekylære forbindelser (små molekyler) med molekylvekt på 200-600 kDa som inneholder 1-12 roterende bindinger. Protein-ligand dokking har et spesielt brukspotensial innen medisin og utvikling av nye legemidler.<sup>69</sup>

Så langt er flere enn 60 dokkingprogrammer kjent.<sup>70</sup> Blant disse er Internal Coordinates Mechanics (ICM)<sup>TM</sup> programmet<sup>71</sup> som kan inkludere strukturell fleksibilitet i ligand og enzym under dokkingen. ICM programmet regnes som et av de beste og mest generelle programmene for dokking.<sup>72</sup> Eksempler på andre mye brukte programmer for dokking er GOLD, DOCK, GLIDE, AUTODOCK, og FLEXX.<sup>73</sup>

Kunnskap om at proteiner ikke er rigide strukturer med tvert imot fleksible og kan forandre konformasjonen og bindingsorientering ved interaksjon med liganden, krever utvikling av nye dokking programmer som tar i betraktning ikke bare ligand fleksibilitet, men også strukturell fleksibilitet i enzymene. Per er i dag flere dokkingprogrammer (inkludert ICM) som også kan ta i bruk fleksibilitet i enzymet ved dokking.<sup>67</sup>

Dokking prosessen foreslår et antall konformasjoner mellom ligand og enzym. Dette antallet er avhengig av antall fleksible aminosyre sidekæder som omgir liganden og ligandens strukturelle fleksibilitet. De foreslåtte konformasjonene må analyseres. Kunnskap fra kjente 3D strukturer av ligand - enzym kompleks og kunnskap fra eksperimentelle studier er verdifull for en slik analyse.

Under dokkingen vil ligander interagerer med forskjellige aminosyrer på enzymets interaksjonssete. Ligandene plasseres i en tre-dimensjonalt grid av jevnt fordelte felt punkter. De forskjellige karakteristiske egenskapene til liganden er forskjellig i hvert grid punkt, og ligandens posisjon blir forandret til man finner et set av grid-punkter som gir maksimal interaksjon med enzymet.<sup>74</sup>

Ved mange drug "design" prosjekter blir store databaser (Tabell 2) av forskjellige forbindelser først undersøkt ved hjelp av dokkingprogrammer for å finne de mest lovende aktive ligandene mot målproteinene som studeres. De mest lovende forbindelsene fra en slik "screening" prosess vil så danne grunnlaget for videre eksperimentelle verifikasjoner. En slik strategi er kjent som "virtual ligand screening" (VS)<sup>73, 75</sup> Valg av forbindelser ved hjelp av VS baserer seg på at man kjenner 3D struktur av mål molekylet og liganden.

Dokking prosessen involverer vanligvis to uavhengige trinn:

1. Hvordan liganden er orientert i forhold til reseptor (target)
2. Evaluering (scoring) av ligand orientering

Det er i hovedsak tre kategorier av dokking:

1. rigid body dokking – når både ligand og protein antas å være rigide
2. semifleksibelt dokking – når bare ligand er fleksibel.
3. full fleksibell dokking – når både ligand og protein er fleksible molekyler i dokking prosessen

Proteiner er fleksible molekyler som eksisterer i en rekke konformasjonelle former, med lave energi barrierer som skiller mellom konformasjonene. Den tredje kategorien er derfor den mest idelle, men er så langt ikke standard for de fleste dokkingprogrammer. Siden ligandmolekylene vanligvis er mye mindre enn proteinene, er det lettere for programmet å håndtere ligand fleksibilitet enn fleksibilitet i “target” proteinet. Semi rigid dokking med rigid target og fleksibel ligand er derfor standard rutine ved dokking prosesser.

Forskjellene mellom dokkingprogrammer ligger i algoritmene som beskriver inter og intramolekylære interaksjoner, algoritmer brukt for å beskrive ligand strukturer, og tid brukt pr. molekyl.

Scoring funksjonene baserer seg stort sett på fri energi av binding (Gibbs energi) gitt ved formelen:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

$\Delta G$  – fri energi av binding,  $\Delta H$  – enthalpy,  $\Delta S$  – entropy og  $T$  – temperatur i Kelvin

$\Delta G$  relateres til inhiberingskonstanten ved formelen:

$$\Delta G = - RT \ln K_i$$

R er gass konstanten.

Det er mange forskjellige metoder som er tilgjengelig for å predikere bindings fri energi av små ligander basert på 3D struktur av protein-ligand komplekser, men metodene er veldig forskjellige med hensyn til nøyaktighet og hastighet.

Det er viktig å filtrere resultatene etter forskjellige dokking prosedyrer (filtre som for eksempel å gjøre en visuell vurdering, eller kombinere med databaserte prosedyrer, topologiske egenskaper, kjemiske forskjeller



for å nevne noen) for å utelukke falske positive svar og dermed selektere virtuelle hits for eksperimentell testing.

Fire viktigste trinn i alle virtual ligand screenings prosesser er:

1. Forberedelse (2D→3D)
2. Filtrering. Kan benytte pharmacophore modellering eller "Lipinskis rule of five" in en filtreringsprosess før dokking. Prediksjon av ADMET egenskapene til molekylene kan også benyttes.
3. Dokking
4. Scoring
5. Postfiltering

Det er mange databaser tilgjengelige "screening", både elektronisk og fysisk.

**Tabell 2.** Oversikt over noen databaser tilgjengelig for virtual ligand screening

Database navn	Størrelse	Web adresse
Chem Navigator	24 000 000	<a href="http://www.chemnavigator.com/">http://www.chemnavigator.com/</a>
ChemMine	5 800 000	<a href="http://www.bioweb.ucr.edu/ChemMineV2/">http://www.bioweb.ucr.edu/ChemMineV2/</a>
GhemDB	4 100 000	<a href="http://www.cdb.ics.uci.edu/CHEMDB/Web/index.htm">http://www.cdb.ics.uci.edu/CHEMDB/Web/index.htm</a>
PubChem	4 000 000	<a href="http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/">http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/</a>
MDL	3 500 000	<a href="http://www.mdli.com">http://www.mdli.com</a>
Zinc	3 381 581	<a href="http://www.blaster.docking.org/zinc/">http://www.blaster.docking.org/zinc/</a>
Enamine	857 000	<a href="http://www.enamine.relc.com/">http://www.enamine.relc.com/</a>
Maybridge	66 000	<a href="http://www.maybridge.com">http://www.maybridge.com</a>

### 1.6.2. Fordeler og ulemper ved dokking.

Fordeler ved dokking er at i lag med eksperimentelle studier kan dette gi optimale resultater i forskjellige situasjoner. Dokking er ikke dyrt sammenlignet med high-throughput screening (HTS) som er mer nøyaktig, men mye mer kostnadskrevede. En VS før eksperimentell testing gjør at det er nødvendig å teste færre forbindelser eksperimentelt. Man kan også benytte seg av filtre som blant annet predikerer biologisk tilgjengelighet og toksisitet, og dermed kan man utelukke flere "dårlige" forbindelser før eksperimentell testing. I tilfeller hvor HTS er umulig å bruke kan dokking også gi verdifull informasjon.

Problemer ved dokking er selvsagt nøyaktigheten av strukturene og algoritmene til programmene. Er strukturen unøyaktig er det ikke mulig å få informasjon om mulige vannmolekyler på det aktive setet som kan ha betydning for aktivitet og må være til stede under dokkingen. Vannmolekylene kan danne hydrogenbindinger med aminosyrene på bindings sete og dermed forstyrre dannelsen av bindinger mellom liganden og enzymet. Vann molekylene kan også rearrangeres ved bindingssete når ligand molekylet bindes. Vannmolekyler kan blant annet mediere binding av liganden eller til og med delta i selve katalyse prosessen. Vannmolekyler kan være et problem ved dokking og VS generelt, og det kan være fordelaktig å kartlegge vann molekylens rolle i hvert enkelt tilfelle. Tautomerisme er et annet problem ved dokking. Tautomerisk form av et molekyl har en annerledes form, funksjonelle grupper, overflate og hydrogen-binding mønster, som i sin tur kan få en avgjørende effekt på affinitet mellom ligand og bindings sete. Som nevnt tidligere er protein target fleksibilitet enno også et problem ved dokking.<sup>75</sup>

## 2. Formålet med studien

TLN og PsE er involvert i mange bakterielle infeksjoner, og hemmere av disse enzymene kan være viktige andre generasjons antibakterielle midler. Den katalytisk mekanismen til TLN er trolig en av mest studerte av alle enzym mekanismer, og derfor har TLN tjent som modell for å studere mekanismen til Zn-metalloproteaser og TLPs. TLPs har mye felles både i struktur og funksjon, og TLN og PsE kan også være viktige modell enzymer for identifisere hemmere av andre TLPs. Studier som kartlegger inhibitorer av TLN og PsE kan dermed også bidra til oppdagelse av potensielle andregenerasjons antibiotika og antihypertensive legemidler.<sup>76</sup>

Zink holdige peptidaser er bredt distribuert i naturen. Vi har endogene metallopeptidaser i kroppen, som ved en riktig mengde og funksjon, er involvert i mange nyttige biologiske prosesser. Eksempel på endogene metallopeptidaser i kroppen er Matriks Metallo- proteinaser (MMP). Overregulering av disse ble registrert ved reumatoid artritt og vekst av kreft svulster.<sup>77</sup> For å ikke hemme de endogene metallopeptidaser som involvert i normale biologiske prosesser i kroppen er selektive metallopetiase hemmere viktig terapeutisk. Skal hemmere av TLN og PsE utvikles til antibakterielle midler er det viktig at de ikke hemmer humane metallopeptidaser, slike som MMP-er. Dette vil kunne gi legemidler med færre bivirkninger. Derfor er det viktig å teste MMP hemmere mot TLN og PsE for å finne ut hva som skal til for å lage midler som hemmer TLN/PsE og ikke MMP-er.

De konkrete målene med oppgave var som følger:

- Det er tidligere blitt utført en teoretisk in silico VS av Maybridge databasen for å finne mulige hemmere av TLN. I denne oppgaven ble 16 forbindelser fra VS studien valgt ut og testet eksperimentelt som mulige hemmere av TLN og PsE.
- Forbindelser som tidligere har vist seg å være gode hemmere av forskjellige MMP-er<sup>78-81</sup> kan også være gode hemmere av TLN og PsE. Dette skyldes de store likhetene i det aktive setet. 50 forbindelser fra samarbeidspartnere som tidligere har vist seg å hemme MMP-er ble derfor testet som mulige hemmere av TLN og PsE. Formålert med dette var å kartlegge likheter/forskjeller i bindingsetet mellom MMP-er og TLN og PsE.
- Fravær eller positivt hemmende effekt av en forbindelse kan forklares ut fra forbindelsens molekylær struktur og de molekylære interaksjoner med det aktive setet. Utvalgte forbindelser ble derfor brukt i dokking studier mot TLN og PsE.

### 3. Materialer og metoder

#### 3.1. Materiale

##### 3.1.1 Forbindelser

50 forbindelser ble tilsendt fra Doktor Christina Campestre (tabell 3, figur 22) ved Universitet "G.d'Annunzio" i Chieti, Italia og Professor A. Rossello (Tabell 4 og Figur 23) ved Universitet i Pisa, Italia.<sup>80, 81</sup> Alle forbindelser ble oppløst i 100 % DMSO

16 forbindelser fra VS prosessen (Tabell 5 og Figur 24) av Maybridge database ble kjøpt inn fra Maybridge, Thermo-Fisher Scientific, United Kingdom. Alle forbindelser ble oppløst i 100 % DMSO

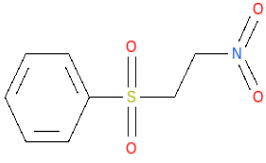
Fluoriscens merket biologisk substrat med sekvens:

Mca-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Ala-Phe-Lys-(Dnp)-OH. Kjøpt fra AnaSpec (34801 Campus Drive, Fremont, USA. ACE, catalog ID: 929-ZN-10; ACE2, 933-ZN-10; ACE substrate, fluorogenic peptide V, catalog ID: ES005). Molekyl vekt 1389,6 g/mol. Foretrukket løsemiddel 100 % DMSO.

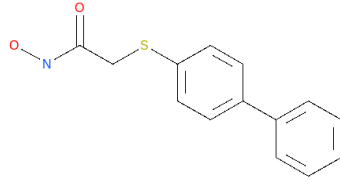
Fluoriscens merket syntetisk substrat med sekvens: Abz- Ala- Gly- Leu- Ala- Nba ble innkjøpt fra Bachem AG (Hauptstrasse 144, 4416 Bubendorf, Switzerland. H-6675, lot: 1009418). Molekyl vekt 583,65 g/mol. Oppløst i 100 % DMSO

Enzymene PsE(30.0 kDa, EC 3.4.24.26), elastase of *Pseudomonas aeruginosa* og TLN (34.6 kDa, EC 3.4.24.27) fra den gram positiv bakterien *Bacillus thermoproteolyticus* ble kjøpt inn fra Calbiochem. ([www.calbiochem.com](http://www.calbiochem.com)) Oppløst i buffer 1 (tabell 6)

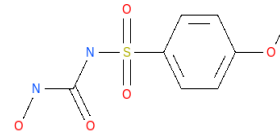
Galardin ble kjøpt fra Calbiochem<sup>R</sup> (Merck Chemicals Ltd. Padge Road, Beeston, NG9 2JR Nottingham, United Kingdom). Foretrukket løsemiddel 100 % DMSO. Molekyl formel C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, molekyl masse på 388.47 g/mol.



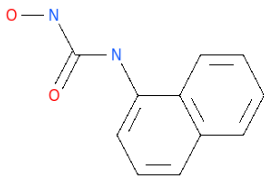
BF421



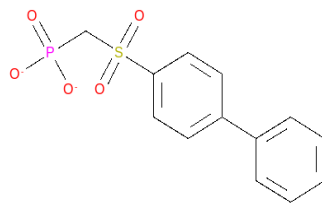
FF33



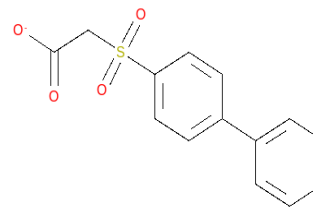
BF255



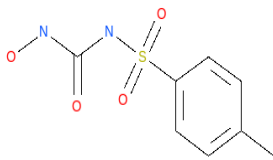
BF 144



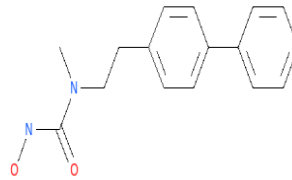
ELE 5



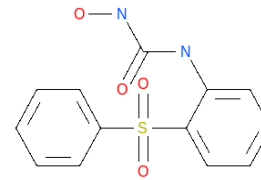
FF 34



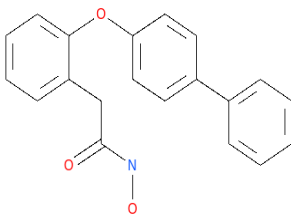
BF 243



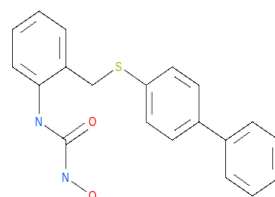
BF 16



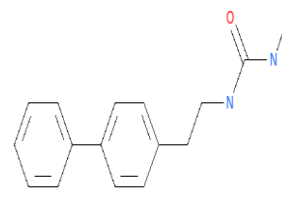
BF 268



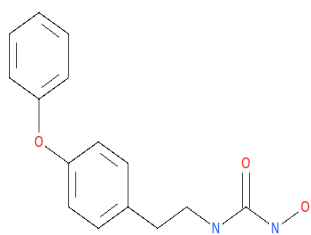
BF282



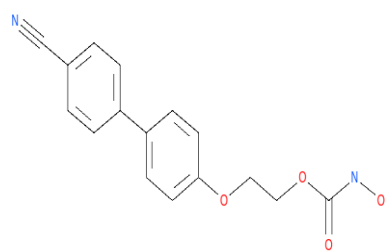
BF298



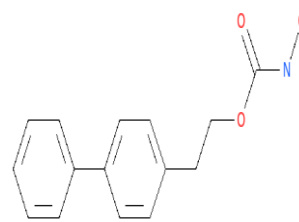
BF17



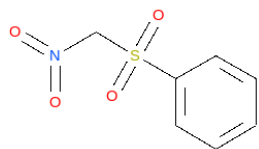
BF58



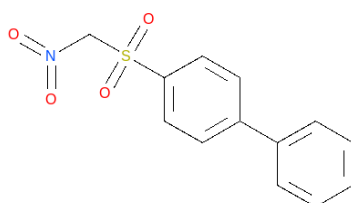
BF66



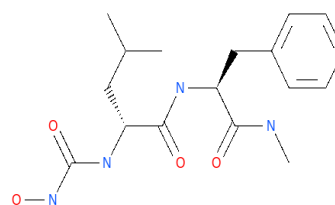
BF20



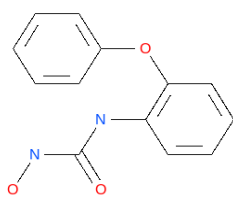
BF 407



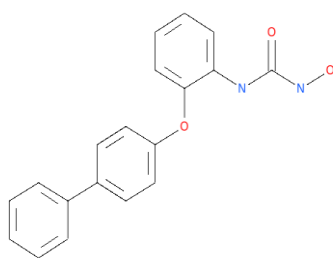
BF 418



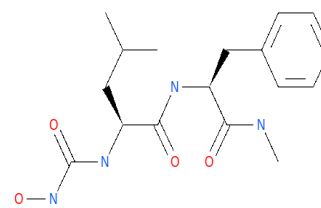
PP 173



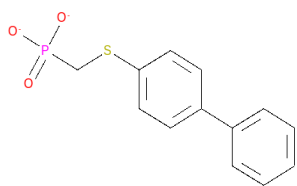
BF249



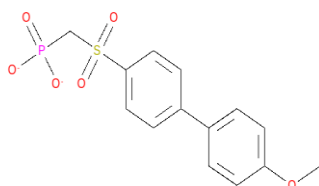
BF252



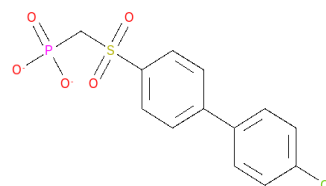
PP170



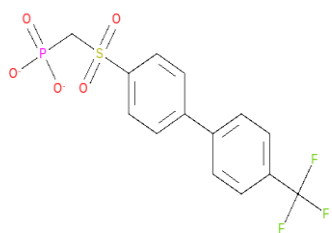
MT260



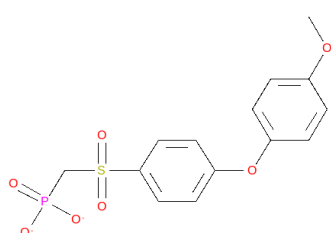
MT113



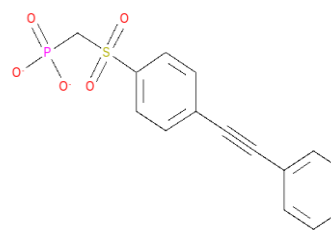
MT137



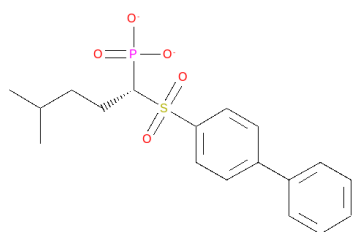
MT155



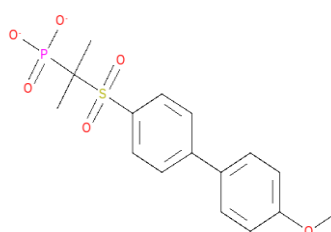
MT152



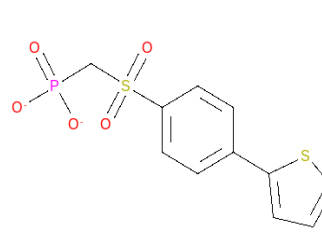
MT200



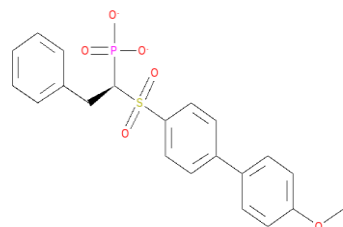
MT 176



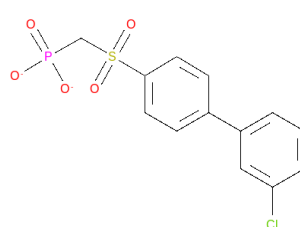
MT 179



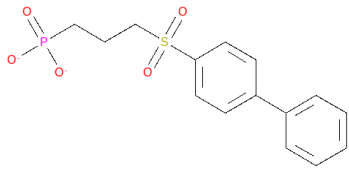
VDL 22



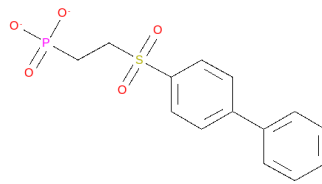
MT35



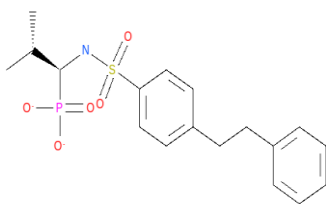
VM19



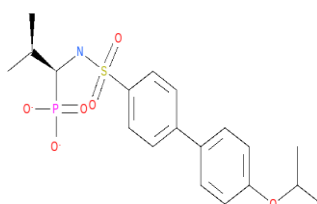
VDL 28



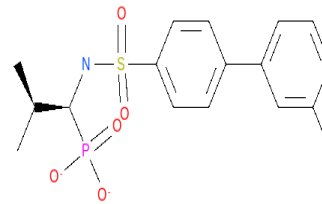
VDL 29



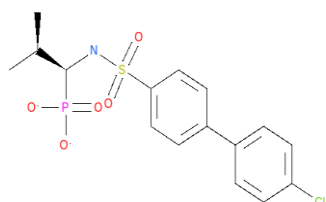
SM 335



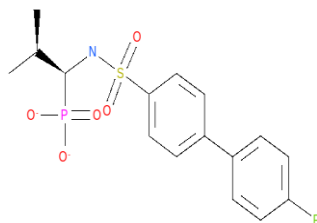
SM 321



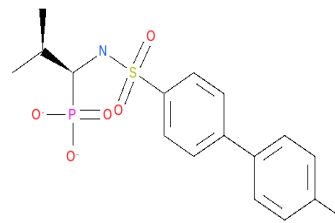
SM 433



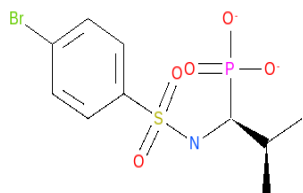
SM 233



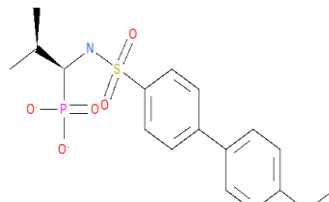
SM 323



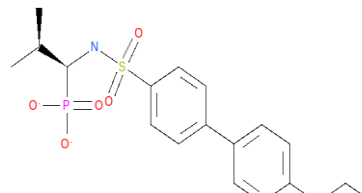
SM 328



SM 434



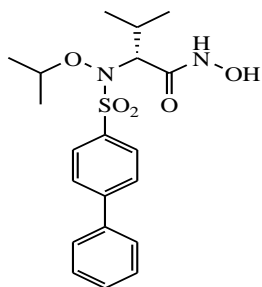
SM 153



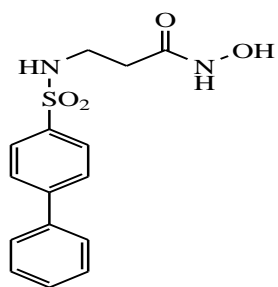
SM 319

Figur 22. Stukturene til forbindelser fra samarbeidspartnere i Italia. Forbindelser fra Dr. Christina Campestre.

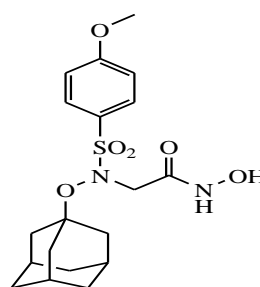




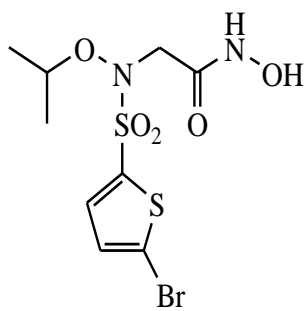
EN 73



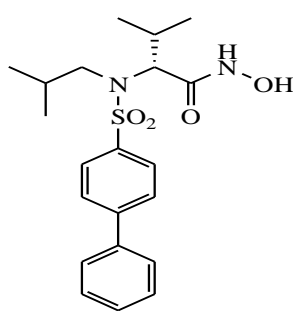
F 09



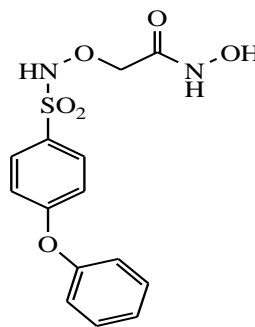
CC 30



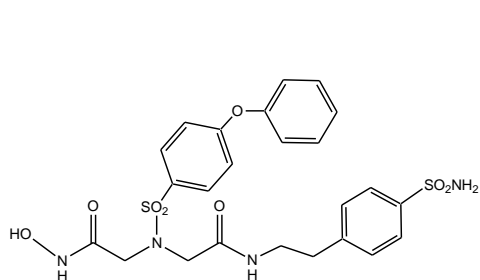
ML 25



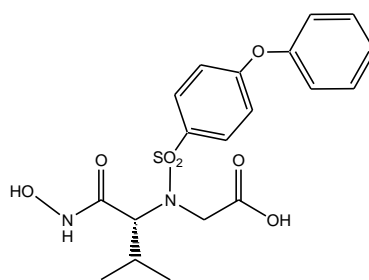
EN 204



FC 107



SM 26



SM 27

**Figur 23.** Struktur til forbindelser fra samarbeidspartnere i Italia. Forbindelser fra Professor Armando Rossello.

**Tabell 3.** Forbindelser fra Dr. Christina Campestre.

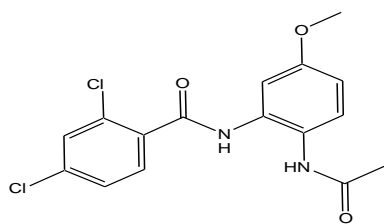
Compound	ZBG	MW	Stokk Kons. mM		Compound	ZBG	MW	Stokk Kons. mM
1 ELE5	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	312.28	6,2764		23 BF255	CONHOH	246.24	8,9344
2 FF34	COOH	276.31	8,1068		24 BF268	CONHOH	292.31	9,9894
3 FF33	CONHOH	275.33	6,6829		25 BF282	CONHOH	319.35	6,2627
4 MT260	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	280.28	8,4202		26 BF298	CONHOH	350.44	5,4788
6 MT137	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73	5,4221		27 BF17	CONHOH	256.30	8,1158
7 MT155	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	326.31	5,516		28 BF58	CONHOH	272.30	8,8138
8 VM19	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73	9,5752		29 BF16	CONHOH	270.33	9,174
9 VDL22	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	318.31	6,1572		30 BF20	CONHOH	257.29	9,4835
10 MT152	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	358.31	8,9308		31 BF66	CONHOH	298.29	7,5095
11 MT200	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	336.31	5,1143		32 BF407	NO <sub>2</sub>	201.20	13,3201
12 VDL29	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	326.31	6,8676		33 BF418	NO <sub>2</sub>	277.30	9,9531
13 VDL28	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	340.34	6,3466		34 BF421	NO <sub>2</sub>	215.23	13,0093
14 MT176	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	368.39	8,1435		35 SM335	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	496.60	4,994
15 MT35	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	432.44	6,0124		36 SM321	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	526.63	5,089
16 MT179	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	340.34	5,8765		37 SM233	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	502.99	4,5329
17 PP170	CONHOH	350.41	7,9906		38 SM323	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	486.54	5,5905
18 PP173	CONHOH	350.41	9,8171		39 SM328	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	482.57	6,4654
19 BF144	CONHOH	202.21	13,2535		40 SM319	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	512.60	3,5895
20 BF243	CONHOH	230.24	11,4663		41 SM433	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	482.57	6,4654
21 BF249	CONHOH	244.25	13,2651		42 SM434	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	471.35	4,7523
22 BF252	CONHOH	320.34	7,1174		43 SM153	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	498.57	4,573

**Tabell 4.** Forbindelser fra Armando Rossello.

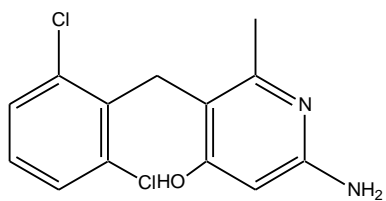
Compound	ZBG	MW	Stokk Kons. mM
EN 73	CONHOH	406,50	3,346
F 09	CONHOH	320,36	6,493
CC 30	CONHOH	410,48	2,826
ML 25	CONHOH	373,24	2,358
EN 204	CONHOH	404,52	3,000
FC 107	CONHOH	338,34	5,911
SM 26	CONHOH	-	2,705
SM 27	CONHOH	-	3,791

**Tabell 5.** Forbindelser fra Maybridge databasen.

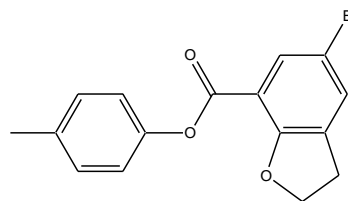
Nr	Maybridge kode	Vekt (mg)	Vekt (g)	MW (g/mol)	Cons. (M)	Mengde DMSO 100 % (mL)	Stok losning cons. mM
1	BTB00534SC	4,2	0,0042	353,2	$1,1891 \cdot 10^{-5}$	1,19	10
2	BTB05964SC	3,6	0,0036	330,0	$1,091 \cdot 10^{-5}$	1,10	10
3	RJF00433SC	5,0	0,005	454,64622	$1,10 \cdot 10^{-5}$	1,10	10
4	KM07174SC	3,5	0,0035	333,17662	$1,051 \cdot 10^{-5}$	1,05	10
5	S04248SC	3,0	0,003	276,73726	$1,084 \cdot 10^{-5}$	1,08	10
6	= 4	-	-	-	-	-	10
7	HTS01508SC	4,0	0,004	361,418	$1,107 \cdot 10^{-5}$	1,11	10
8	SEW06251SC	3,0	0,003	285,249766	$1,052 \cdot 10^{-5}$	1,05	10
9	SPB06467SC	4,0	0,004	350,124229	$1,143 \cdot 10^{-5}$	1,14	10
10	CD11061SC	3,2	0,0032	296,15584	$1,081 \cdot 10^{-5}$	1,08	10
11	BTB11546SC	4,1	0,0041	371,83806	$1,103 \cdot 10^{-5}$	1,10	10
12	CD02664SC	4,0	0,004	354,167703	$1,129 \cdot 10^{-5}$	1,13	10
13	RJC03838SC	2,5	0,0025	214,26396	$1,167 \cdot 10^{-5}$	1,17	10
14	CD03825SC	3,4	0,0034	262,09536	$1,297 \cdot 10^{-5}$	1,30	10
15	S11543SC	3,0	0,003	272,69066	$1,10 \cdot 10^{-5}$	1,10	10
16	KM02957SC	4,3	0,0043	368,810163	$1,166 \cdot 10^{-5}$	1,17	10
17	SPB03250SC	2,5	0,0025	237,64242	$1,052 \cdot 10^{-5}$	1,05	10



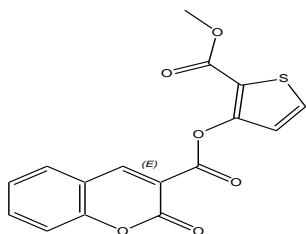
BTB00534 (1)



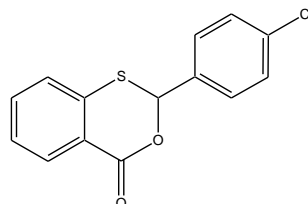
RJF00433 (3)



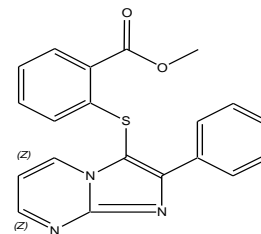
KM07174 (4)



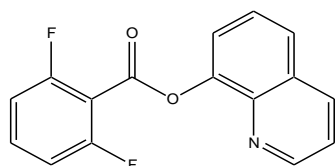
BTB05964 (2)



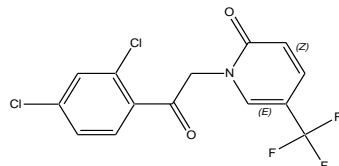
S04248 (5)



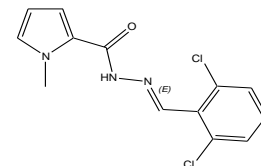
HTS01508 (7)



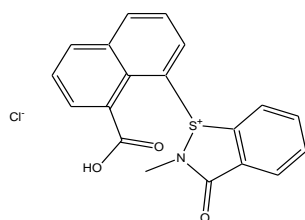
SEW06251 (8)



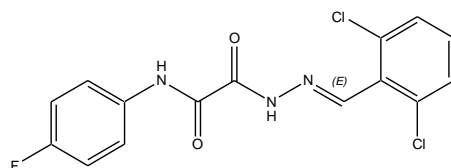
SPB06467 (9)



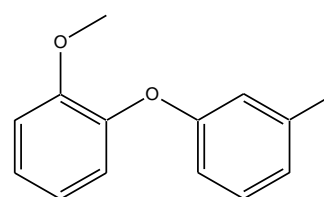
CD11061 (10)



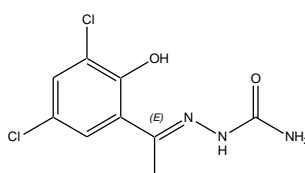
BTB11546 (11)



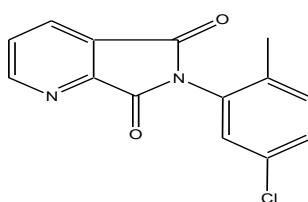
CD02664 (12)



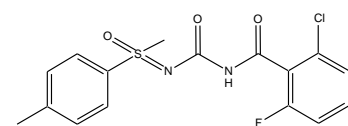
RJC03838 (13)



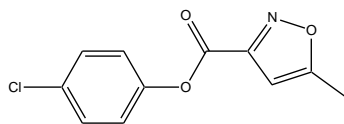
CD03825 (14)



S11543 (15)



KM02957 (16)



SPB03250 (17)

Figur 24. Molekylær struktur til forbindelser i tabell 5.

### 3.1.2 Buffersammensetning

Buffer 1: Oppsett fra samarbeidspartnerer i Italia (se i Tabell 6). Buffer inneholder ikke DMSO og ble brukt for å lage fortyngninger av substrater og enzymer.

Buffer 2: Buffer med 10 % DMSO. Formålet med buffer 2 er å gjøre konsentrasjonen av DMSO jevn i alle forsøkene uavhengig avkonsentrasjonen av hemmer. Dermed elimineres DMSO som en feilkilde i forsøkene. Både hemmer og substrat i forsøkene ble løst opp i 100 % DMSO. Ved tillaging av fortyngningsrekke med hemmerforbindelser reduseres mengde DMSO til lengre ut i i fortyngningsrekka man kommer. Ved å bruke buffer 2 ved tillaging av fortyngningsrekka så blir DMSO mengden lik i alle Ependorf rør i fortyngningsrekka.

**Tabell 6.** Forbindelser (med konsentrasjon) brukt til å lage buffer 1,2,3 og 4 som ble brukt i forsøkene.

Substanser	Buffer 1 per	Buffer 2 per	Buffer 3 per	Buffer 4 per
	100 ml pH 7,27	100 ml pH 7,35	10 ml pH nøytral	10 ml pH 7,30
1M HEPES pH 7,5 (ml)	10,000	10,000	1,000	1,000
1M CaCl <sub>2</sub> (ml)	1,000	1,000	0	0,100
30 % Brij 35 (µl)	17,000	17,000	0	1,70
100 % DMSO (ml)	0	10,000	0	0,220
Destillert vann (ml)	88,983	78,983	9,000	8,68

Buffer 3: Brukt i forsøket hvor konsentrasjon av Galardin ble bestemt ved hjelp av spektrofotometer. Bufferen består av 1 ml HEPES 1 M + 9 ml destillert vann.

Buffer 4: Ble brukt i forsøket hvor bindingskarakter av hemmere ble bestemt.

### 3.1.3 Enzym assay

Enzymene ble først løst i buffer (0.1 M HEPES pH 7.5, 10 med mer  $\text{CaCl}_2$ , 0.005% Brij 35, 150 mM NaCl). Dette gav PsE enzym med konsentrasjon på 3  $\mu\text{M}$  og TLN enzym med konsentrasjon 1269 nM.

Både PsE og TMN ble videre fortynnet med buffer 1 (se tabell 6) inntill nødvendige arbeidskonsentrasjoner for enzymene ble oppnådd:

- av PsE på 6.90 nM og av TMN på 4.38 nM
- ved å bruke 5  $\mu\text{l}$  av disse i brønn på plate/kyvette (total volumet av assay 100  $\mu\text{l}$ ) gav dette en konsentrasjon av PsE på 0.35 nM. Konsentrasjon av TNM i brønn på plate/kyvette ble 0.22 nM.

Enzymkonsentrasjonen holdes konstant, mens konsentrasjonen av hemmer var forskjellig i eksperimentene.

Eksperimentene med Galardin: Konsentrasjon av TLN i hver brønn på svart Costar plate med klar bunn var 0.22 nM, mens konsentrasjon av PsE var 0.26 nM.

### 3.1.4 Substat assay

Naturlige substrater til PsE og TLN er komplekse og store molekyler. Det er vanskelig å predikere kløyvingseter og hvilke proteiner som kan være substrat til peptidaser. De fleste databaser som omhandler substratspesifisitet må derfor baseres på eksperimentell informasjon om substrat spesifisitet.

Substratene brukt i oppgaven er syntetiske og relativt små molekyler sammenlignet med de naturlige substratene til disse to enzymene.

#### **A.** Bradykinin lignende substrat (BSL).

BSL er et gult pulver ferdig fordelt i plomberte mørke glassbeholdere i mengder på 0,5 mg. Ved å tilsette 400  $\mu\text{l}$  100 % DMSO blir konsentrasjonen av substrat i stokkløsning 900  $\mu\text{M}$ . Mca fluorescence er quenched av Dnp gruppe inntil enzym kløyving separer. Det er foreløpig ukjent hvor TLN og PsE kløyver substratet.

Dette substratet har eksitasjon ved 328 nm og emisjon ved 393 nm. Eksitasjon/Emisjons spektra på henholdsvis 320-340 og 400-420 ble brukt. Dette substratet har så langt vi vet ikke tidligere blitt brukt til

studier av PsE og TLN, men har vært brukt til studier av hemmere og enzym kinetikk studier av andre zinc-metalloproteaser.

Struktur til Bradykinin lignende subbstrat er:

Arg – Pro – Pro – Gly – Phe – Ser – Pro – Phe – Arg.

10  $\mu$ l av substrat stokkløsning ble tilsatt 440  $\mu$ l av buffer 1 (se tabell 6), noe som gav en arbeidskonsentrasjon på cirka 20  $\mu$ M. Ved å bruke 20  $\mu$ l fortykning med konsentrasjon på 20  $\mu$ M (volum av essayet per brønn på plateleser er 100  $\mu$ l) ble konsentrasjonen av substratet 4  $\mu$ M i hver brønn (konsentrasjon som ligger under  $K_m$  verdi for begge enzymer).

## **B. Substrat AGLA**

AGLA er et kjent substrat for MMP og TLN. Substratet er satt sammen av følgende grupper:

Abz – Ala – Gly – Leu – Ala – Nba, og kløyves mellom Gly og Leu

Substart er hvite krystaller som lar seg løse i 100 % DMSO. Det er et syntetisk fluorescerende protease substrat. Abz er quenched med Nba. Før gruppene separeres ble det avgitt bare et svakt fluorescerende signal, men etter kløyving separeres gruppene fra hverandre, og fluorescerende gruppe Abz kan ikke overføre energi til Nba (quenching akseptor gruppe). Derfor kan høy fluorescens signal som opptrer etter substrat kløyving relateres til enzymaktivitet.

Eksitasjon for dette substratet er 330/10 nm mens emisjon er 460/10 nm.

Ved å bruke buffer 1 (se tabell 6) ble stokkløsning på 2 mM laget. 20  $\mu$ l av stokkløsning ble overført til hver brønn på plate/kyvette (total volumet av assay 100  $\mu$ l), noe som gav en substratkonsentrasjon i assayet på 75  $\mu$ M. Denne konsentrasjonen ligger under substratets  $K_m$  verdi for begge enzymene.

### 3.1.5 DMSO

Både hemmere og substrat ble løst opp i Dimethyl sulfoxide (DMSO). DMSO er en gjennomsiktig væske og blir mye brukt ved kjemisk syntese, biokjemiske studier og i cellebiologi.<sup>82</sup> DMSO løser opp både polare og ikke polare forbindelser og kan blandes med vann. Løsemiddelet har kokepunkt på 189 °C og frysepunkt på 18,5 °C. DMSO kan lett trenge gjennom huden og andre biologiske membraner uten å ødelegge, og kan derfor være bærer for andre forbindelser inn i biologiske systemer.<sup>83</sup> Dermed må man være veldig forsiktig når man jobber med stoffer som er oppløst i DMSO, spesielt giftige stoffer. DMSO har lav toksisitet<sup>84</sup> og brukes også som kryobeskytter og tilsettes cellekulturer for å forebygge celleødelegelser under frysing.<sup>85</sup> Valg av hansker når man jobber med DMSO er veldig viktig. Nitril hansker beskytter ikke mot DMSO.<sup>86</sup>, siden de løser seg opp i DMSO.

For å få DMSO konsentrasjon under kontroll under forsøkene ble buffer 2 laget (se tabell 6). Det ble beregnet at fortynnet substrat inneholder 2,2 % DMSO som gir DMSO konsentrasjon i hver enkelt brønn på 0,44 % (det er 20 µl substrat i totalt 100 µl assay i brønn).

Hver enkelt hemmer substans i fortynnings rekke inneholder 10 % DMSO (på grunn av fortynnings rekke ble laget med buffer 2 som inneholder 10 % DMSO). Det gir DMSO konsentrasjonen i hver enkelt brønn på 1 % (det er 10 µl hemmer i totalt 100 µl assay i brønn).

Mengde DMSO i assay brukt under forsøkene er summen av DMSO fra substrat (0.44 %) og fra hemmer (1.00 %). Til sammen blir dette 1.44 % DMSO i hver brønn på plate. Dette er en konsentrasjon som er vel tolerert av enzymene. TLN tolererer konsentrasjoner av DMSO opp til 10 % v/v.<sup>87</sup> O. Adekoya i sine tidligere eksperimenter (ikke publisert) har eksperimentert med effekt av DMSO på PsE og kommet til at konsentrasjon av DMSO over 10 % påvirker PsE aktivitet og muligens skader enzymet. Det var allikevel hensynmessig å bruke samme konsentrasjon av DMSO i alle løsninger i fortynningsrekke (buffer 2 med 10 % DMSO) for å utelukke DMSO som feilkilde.

Essay sammensetning, samt DMSO konsentrasjon ble nøyaktig det samme for TNM og PsE i alle forsøk det gjelder bestemmelse av IC<sub>50</sub> verdi.



## **3.2. Apparater, maskinvarer, metoder som ble brukt**

### **3.2.1. Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence spectrometer LS 50 B**

Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 B, ble brukt til å bestemme  $K_m$  verdier for begge substrater mot begge enzymer. Dette var gunstig for å velge riktig konsentrasjon av enzym og substrat for videre eksperimenter.

Apparatet er veldig følsomt men har en ulempen med at det er en veldig tidkrevende og kostbar metode for å teste forbindelser. Emisjon og Eksitasjon ble innstilt avhengig av bølgelengder til substratet. Respons ble innstilt på 1.50, tid 60 sek. Det ble gjort tre paralleller for hver konsentrasjon av substratet for å bestemme  $K_m$  verdier.

Apparatet ble også brukt til å undersøke hemmings kinetikk til de mest interessante hemmerne.

Det er problematisk å få innstilt og oppretholde nødvendige temperaturer under forsøkene, både for substansene og for selve kyvetten (bruk av vannbad). Videre er selve pipeteringen en tidskrevende prosess, og ved vask og håndtering av kyvetter kan også være problematisk. Men apparatet er regnet som mer nøyaktig enn plateleser på grunn av mer sensitiv photomultiplier tube.

### **3.2.2. Spectra MAX Gemini EM fluorometer**

Hovedparten av de praktiske forsøkene ble utført ved hjelp av fluorometer Spectra MAX Gemini EM plateleser.

Spectra MAX Gemini EM fluorometer er en fluorescensplateleser. Prøvene settes på mikroplate (96 brønner) ved hjelp av multipipette. Det gjør det mulig å teste alle konsentrasjonene av hemmerne samtidig i flere paralleller. Det er mulig å innstille ønsket temperatur slik at det er mulig både å preinkubere forbindelser og å gjøre forsøk under strengt kontrollerte betingelser ved ønsket temperaturer. Dette gjør at et større antall forbindelser kan undersøkes uten stort forbruk av tid og økonomiske resurser. Man trenger ikke vaske platene og dermed unngår man også faren for kontaminasjon.

Ulempen med apparatet er at det antas at fotomulti player er litt mindre følsomt/nøyaktig enn Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence spectrometer LS 50 B. Men samtidig viste kontrollforsøkene med Galardin mot TLN og PsE at våre målinger var i samsvar med resultater fra litteraturen. Vår løsning ble først å bruke Spectra MAX for å identifisere de mest interessante forbindelsene, og så teste nærmere de mest interessante ved hjelp av Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence spectrometer LS 50 B.

Innstillinger til Spectra MAX Gemini, og bruk av costar svart plate med klar bunn ble valgt basert på intielle forsøk og forarbeid. Det er flere typer av plate som kan velges og det er flere måter å avlese verdiene på. Under initielle forsøk ble flere innstillinger og to typer plater brukt, med avlesning fra topp og bunn før vi kom fram til de de innstillinger som ble brukt. Bølgelengde var oppgitt.

Det ble bestemt at prøvene skulle innkuberes i 15 min ved 37 °C og at forsøkene skal kjøres i 30 min ved 37 grader Cels aktuelle brønnene velges manuelt ius. Valg av riktige konsentrasjoner av enzymet (0.22 nM i brønn på plate for TLN og 0.35 nM for PsE) og substrat (4 µM i brønn) gjør det mulig å få fine og lineære grafer utover 30 min. Preinkubering har ikke negativ effekt på enzymaktivitet. Temperaturen på 37 grader hadde ingen negativ effekt på enzymets aktivitet og ble dermed valgt siden det er tilnærmet fysiologisk kroppstemperatur.

Det viste seg å være viktig å lage nye fortyninger av enzym og substrat til en dags forsøk (hver dag ny fortyninger), og ikke oppbevare fortyningen i kjøleskapet til dagen etter siden aktiviteten til enzymet og substrat går ned med tiden etter tilberedning. Bufferer bør også lages med 1-2 ukers mellomrom. pH i bufferer ble kontrollert ved hver ny tilleggning  $pH_{av} = 7.3$ .

Spectra MAX ble innstilt på: basic kinetic protocol, fluorescence, bottom read, eksitasjon på 328 nm, emmisjon på 393 nm, none auto cutoff, normal sensitivitet, 30 minut "run time" (ikke tatt hensyn til preinkubering), automiks før første avlesning, auto read-off, temperatur 37 °C. Svart Costar plater 96 brønn med klar bunn ble brukt, og de aktuelle brønnene ble valgt manuelt.

Preinkubering av plater foregår i selve apparatet ved 37 °C 15-30 min (avhengig av forsøk). Etter preinkubering tas platen ut → substrat settes på og plate sendes tilbake inn for avlesning i 30 min ved temperaturen på 37 °C. Enkelte forbindelse ble avlest i løpet av en time for å se om tiden påvirket resultatene.

Det ble brukt svart Costar 96 brønn plater med klar bunn og fluorescensen ble avlest fra bunn. Innstillingene som ble valgt var basert på et stort forarbeid hvor blant anna svart Costar 96 brønn plate med svart bunn og fluorescensen ble avlest fra topp. Kvaliteten på grafene og avleste verdier ble avgjørende ved valg av type plate og apparat innstillinger.

### 3.2.3. Sigmaplot og Enzym Kinetikk dataverktøy

Sigmaplot og Enzymkinetikk programmer ble brukt for å håndtere rådata, beregninger og plotting av grafer.

Programmet bruker (ligning 23) for å beregne  $pIC_{50}$ . Videre ble  $IC_{50}$  verdi beregnet fra (ligning 25).

$$V_i/V_0 = V_i/V_0 \max / (1 + 10^{(pIC_{50} - p[I])}) \quad (23)$$

$$pIC_{50} = -\log IC_{50} \quad (24)$$

$$IC_{50} = 10^{(-pIC_{50})} \quad (25)$$

### 3.2.4. ICM

ICM dokking programmet ble brukt for å se hvordan forbindelser av interesse kunne binde til TLN og PsE.

2D strukturer av forbindelser ble først konvertert til 3D format ved hjelp av ICM programmet.

Røntgenkrystallstrukturer av TLN (PDB kode: 1PE7) og PsE (PDB kode: 1U4G) ble lastet ned fra Brookhaven Protein Data Bank (PDB).<sup>88</sup> Disse strukturene er krystallisert med zinc bindende inhibitorer på det aktive setet. Enzymstrukturene ble konvertert til ICM objekter og inhibitorene som var bundet til zinc og krystallvann ble fjernet. Zn-ionet ble markert og nabo aminosyrer kalibrert, og en bindingslomme i et område på 5Å rundt Zn ble definert slik at mulige aminosyrer for binding av forbindelsene ble inkludert i bindingsetet. Ligandene ble så dokket inn i enzymene ved hjelp av "batch dokking" modulen i ICM. Denne metoden innebærer at alle forbindelser ble dokket samtidig mot et enzym av gangen. Alternativt kunne man brukt regulær dokking hvor man dokker og analyserer en forbindelse av gangen. Samme ICM oppsett ble brukt både for TLN og PsE. Dokkingene ble utført med rigid target (enzym) og fleksible inhibitorer. Konformasjoner hvor inhibitorerne interagerer med zinc ble videre analysert. Mulige interaksjoner (inkludert hydrogen bindinger) med aminosyrer på det aktive setet (spesielt HEEXH fragmentet) ble kartlagt, og dokking energi ble beregnet.

### 3.3. Utføring av praktiske forsøk

#### 3.3.1. Enzymkinetikk. $K_m$ bestemmelse.

➤ AGLA substrat TLN og PsE.

- Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 B, ble brukt til å bestemme  $K_m$  verdier. Rom temperatur. Eksitasjon 330/10 nm, emisjon 460/10 nm. Assay i hver kyvette: 65  $\mu$ l buffer 1 (se tabell 6), 20  $\mu$ l substrat, 10  $\mu$ l buffer 2 (se tabell 6), 5  $\mu$ l enzym. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 43.76 nM (gir 2.24 nM i kyvette), PsE - 100.00 nM (gir 5 nM i kyvette), AGLA stokkløsning på 2 mM ga konsentrasjoner i kyvette på 400, 200, 100, 80, 60, 50, 40, 30  $\mu$ M. Fortynninger av enzymer og substrat ble utført med buffer 1. pH i forsøk var 7.3. Rekkefølge for blanding: Buffer 1  $\rightarrow$  buffer 2  $\rightarrow$  enzym  $\rightarrow$  substrat.

➤ BLS substrat TLN og PsE

- Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 B, ble brukt for å bestemme  $K_m$  verdier. Rom temperatur. Eksitasjon 328/10 nm, emisjon 393/10 nm. Assay i hver kyvette: 65  $\mu$ l buffer 1 (se tabell 6), 20  $\mu$ l substrat, 10  $\mu$ l buffer 2 (se tabell 6), 5  $\mu$ l enzym. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 43.76 nM (gir 2.08 nM i kyvette), PsE - 100.00 nM (gir 5 nM i kyvette), BLS stokkløsning på 20  $\mu$ M ga konsentrasjoner i kyvette på 10, 7.14, 4.76, 3.81, 2.86, 1.91, 0.95  $\mu$ M. Fortynninger av enzymer og substrat ble utført med buffer 1. pH i forsøket var 7.3. Rekkefølge for blanding: Buffer 1  $\rightarrow$  buffer 2  $\rightarrow$  enzym  $\rightarrow$  substrat.

#### 3.3.2. Eksperimenter med bindingsassay og plateleser

➤ BLS substrat TLN og PsE

- Spektra MAX Gemini EM plateleser og svart costar 96 brønn plater med klar bunn ble brukt. Eksitasjon 328/10 nM, emisjon er 393/10 nM. Preinkubering 15 min ved 37 °C. Avlesing av reaksjonshastighet i 30 min ved 37 °C etter substrat påsetting. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 4.376 nM (gir i brønn 0.21 nM), PsE - 6.67 nM (gir i brønn 0.33 nM), BSL - 20  $\mu$ M (gir i brønn 4  $\mu$ M). Fortynninger av enzym og substrat utført med buffer 1 (se tabell 6). Hemmer forbindelser (tabell 3,4 og 5) fortynnet med faktor 10 med buffer 2 (se tabell 6). Buffer 2 brukt som kontroll. Hjelpeplater og multipipetter ble brukt for påsetting av stoffer. Assay i hver kyvette: 65  $\mu$ l buffer 1

(se tabell 6), 20  $\mu$ l substrat, 10  $\mu$ l hemmer/buffer 2 (se tabell 6), 5  $\mu$ l enzym. Rekkefølge for blanding: Buffer1→buffer 2→enzym→preinkubering→substrat. pH i forsøkene er 7.3.

➤ AGLA substrat TLN og PsE

- Spektra MAX Gemini EM plateleser og svart costar 96 brønn plater med klar bunn ble brukt. Eksitasjon 330/10 nM, emisjon 460/10 nM. Preinkubering 15 min ved 37 °C. Avlesing av reaksjonshastighet ( $V_0$  og  $V_i$ ) i 30 min ved 37 °C etter substrat påsetting. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 4.376 nM (gir i brønn 0.21 nM), PsE - 6.67 nM (gir i brønn 0.33 nM), AGLA - 75  $\mu$ M (gir i brønn 15  $\mu$ M). Fortynninger av enzym og substrat utført med buffer 1 (se tabell 6). Hemmer forbindelser (tabell 3,4 og 5) ble fortynnet med faktor 10 med buffer 2 (se tabell 6). Buffer 2 brukt som kontroll. Hjelpeplater og multipipetter ble brukt for påsetting av stoffer. Assay i hver kyvette: 65  $\mu$ l buffer 1 (se tabell 6), 20  $\mu$ l substrat, 10  $\mu$ l hemmer/buffer 2 (se tabell 6), 5  $\mu$ l enzym. Rekkefølge for blanding: Buffer1→buffer 2→enzym→preinkubering→substrat. pH i forsøkene var 7.3.

### 3.3.3. Bestemmelse av reel konsentrasjon av Galardin.

1 mg Galardin (GM-6001) ble oppløst i 1 ml 100 % DMSO. Oppløsning ble fordelt i Ependorf rør på 20  $\mu$ l hver og rørene ble frosset ned ved -20 °C.

I litteraturen oppgis det at Galardin har en  $K_i$  verdi på 20 nM for TLN og PsE <sup>46</sup>.

1mg/ml løsning av Galardin i 100 % DMSO gir en konsentrasjon av Galardin på 2.57 mM.<sup>89</sup>

1mg/1ml → 1 $\mu$ g/1 $\mu$ l → 2,57 mM

2,6 mM = 2600  $\mu$ M – konsentrasjon i frosne rør.

Galardin molekylet inneholder en Tryptophan del i strukturen. I følge Grobelny et al., 1992, er absorpsjonsmaksimum for Tryptophan ved 278.00 nm på 5.579.<sup>46</sup>

$$\epsilon_{278 \text{ nm}}^{1\text{mM}} = 5.579$$

Konsentrasjon av Galardin i frosne Ependorf rør ble dermed bestemt ved 278.00 nm.

Siden en molare absorptivitet på 5.579 er alt for stor til detektering ved hjelp av Perkin Elmer Lambda 16 UV/VIS Spektrofotometer ble det laget en 0.1 mM fortynning av Galardin fra de frosne rørene. Forventet absorpsjon nå blir 0,5579.

$$\epsilon_{278 \text{ nm}}^{0.1 \text{ mM}} = 0.5579$$

Det ble beregnet en mengde på 494  $\mu\text{l}$  buffer 3 (se tabell 6) for å fortynne 20  $\mu\text{l}$  Galardin til en konsentrasjon på 0.1 mM av Galardin i løsning. Absorbansen i løsning ble målt til 0.52575 ved hjelp av Perkin Elmer spektrofotometer, og en reell Galardin konsentrasjon på 2.42 mM i frosne Ependorf rør ble beregnet.

### 3.3.4. Kontrollforsøk med Galardin.

**Tabell 7.** Fortynnings rekke for galardin for både thermolysin og pseudolysin

Fortynning i ependorf rør	Konsentrasjon i ependorfrør	Fortynning i brønn	Konsentrasjon i brønn
$10^{-4}$	260 $\mu\text{M}$	$10^{-5}$	26 $\mu\text{M}$
$10^{-5}$	26 $\mu\text{M}$	$10^{-6}$	2,6 $\mu\text{M}$
$10^{-6}$	2,6 $\mu\text{M}$	$10^{-7}$	0,26 $\mu\text{M}$
$10^{-7}$	0,26 $\mu\text{M}$	$10^{-8}$	26 nM
$10^{-8}$	26 nM	$10^{-9}$	2,6 nM
$10^{-9}$	2,6 nM	$10^{-10}$	0,26 nM

Assay i brønner er 100  $\mu\text{l}$  i volum og består av: 5  $\mu\text{l}$  Pse/TLN + 20  $\mu\text{l}$  substrat + 10  $\mu\text{l}$  Galardin + 65  $\mu\text{l}$  buffer 1 (buffer uten DMSO, se i tabell 6). Påsatt med multipipetter, pre inkubert i 15 min ved 37 grader Celsius. Kjørt i 30 min ved 37 grader. pH var 7,3

### 3.3.5. Hemningsmekanismer

➤ AGLA substrat TLN og PsE.

4. Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 B, ble brukt for å bestemme hemningsmekanismer. Rom temperatur. Eksitasjon 330/10 nm, emisjon 460/10 nm. Assay 100 µl i hver kyvette:buffer 1 (se tabell 6), substrat + buffer 4 (se tabell 6), 10 µl buffer 2/hemmer (se tabell 6), 5 µl enzym. Buffer 2 ble brukt i stedet for hemmer for å lage standard kurve. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 43.76 nM (gir 2.24 nM i kyvette), PsE - 100.00 nM (gir 5 nM i kyvette), AGLA stokkløsning på 2 mM ga konsentrasjoner i kyvette på 200, 150, 100, 75, 50, 41.5,33.3, 25 og 20 µM. Hemmer konsentrasjoner som ble brukt under er gitt i figur tekstene til hver forbindelse. Rekkefølge for blanding: Buffer 1→buffer 2→enzym→substrat.

➤ BLS substrat TLN og PsE

- Fluorimeter Perkin Elmer Luminiscence Spectrometer LS 50 B, ble brukt for å bestemme hemningsmekanismer. Rom temperatur. Eksitasjon 328/10 nm, emisjon 393/10 nm. Assay 100 µl i hver kyvette:buffer 1 (se tabell 6), substrat + buffer 4 (se tabell 6), 10 µl buffer 2/hemmer (se tabell 6), 5 µl enzym. Buffer 2 brukt ble brukt i stedet for hemmer til å lage standard kurver. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 43.76 nM (gir 2.24 nM i kyvette), PsE - 100.00 nM (gir 5 nM i kyvette), BSL i stokkløsning på 20 µM ga konsentrasjoner i kyvette på 10, 6.67, 5, 4,3.33, 2.86, 2.5 og 2.0 µM. Hemmer konsentrasjoner som ble brukt under forsøkene er gitt i figur teksten til hver aktuell forbindelse. Rekkefølge for blanding: Buffer 1→buffer 2→enzym→substrat.

## 4. Resultater og diskusjon:

TLN og PsE er sykdomfremkallende virulens faktorer produsert av en rekke patogene mikroorganismer. Økende bakteriell resistens mot antibiotika er et velkjent problem under behandling av bakterielle infeksjoner. Kunnskap om hvordan TLN og PsE kan hemmes kan være nyttig i "design" og utvikling av neste generasjon av antibakterielle legemidler. Kroppsegne TLPs er blant annet involvert i regulering av blodtrykk (neprilysin, Angiotensin converting enzym). Strukturelle og funksjonelle likhetstrekk mellom TLN og Angiotensin Converting Enzyme (ACE-1) indikerer at TLN også kan brukes som modell system til å "design" nye molekyler med mulig blodtryksregulerende effekter. Dette har blant annet resultert i ACE-hemmere til behandling av høyt blodtrykk.

Mange små organiske molekyler er funnet å hemme TLN. Det er foreslått at største antall av TLN hemmere inneholder strukturelle felles fragmenter som koordinerer til det katalytiske Zn-ion. Oksygenatomer i disse fragmentene er viktige for å danne bindinger med Zn-ion.<sup>90-92</sup> Molekylene som hemmer TLN er ofte derivater av fosfater<sup>93-96</sup>, sulfater<sup>94</sup> eller de inneholder en hydroksammat syredel<sup>46</sup>.<sup>92</sup> Geometrien i Zn-koordinering er avgjørende for stabiliteten til enzym-hemmer komplekset.

I dette studiet har vi testet en rekke forbindelser mot enzymene TLN og PsE, som tidligere har blitt vist å være gode hemmere av MMP-er. Det er klare strukturelle fellestrekk mellom MMP-er og TLN og PsE, og hypotesen var at de også var gode hemmere av M4 proteasene TLN og PsE. Resultatene viste imidlertid at de fleste ikke inhiberte TLN og PsE i det hele tatt, mens andre gav en viss hemming. Forbindelse FF33 (inneholder hydroksammat som Zn-bindende gruppe) har lavest IC<sub>50</sub> verdi mot begge enzymene for begge substratene (tabell 8). Dette indikerer at forbindelsen er en uspesifikk svak hemmer av TLN og PsE.

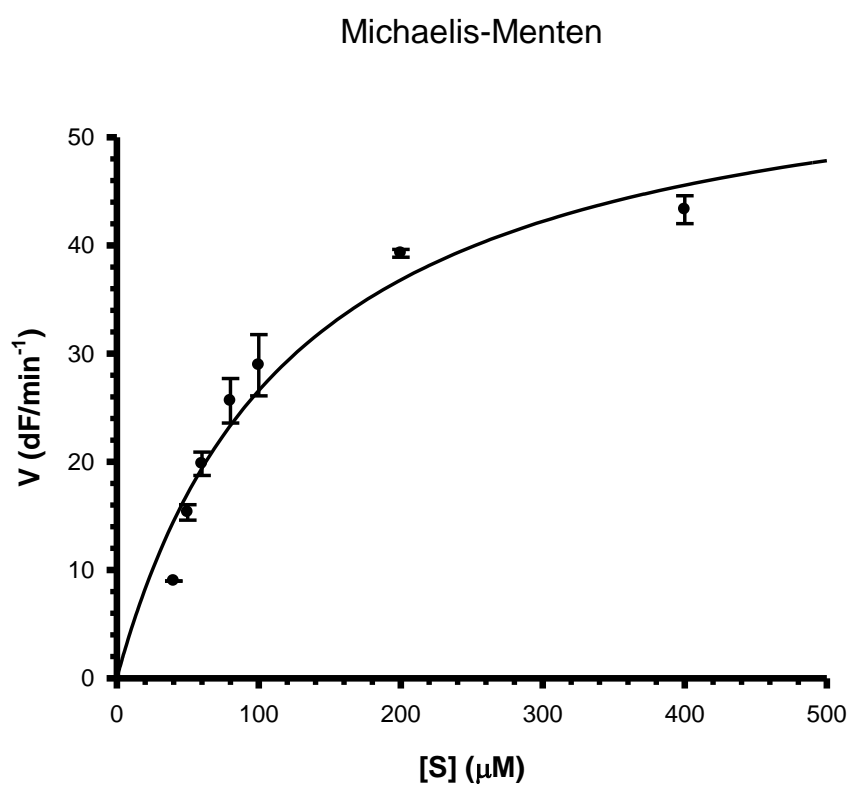
Forbindelse SM 434 (inneholder en fosfat gruppe som Zn-bindende gruppe) viste seg å være en hemmer av PsE, men ikke av TLN (tabell 8). Dokking tyder på at forbindelsen ikke binder direkte til det katalytiske Zn, men er likevel en kompetitiv PsE hemmer (Figur 53). Strukturen til SM 434 kan være en hint for videre utvikling av selektive PsE hemmere.

Det at hemmere av MMP-er (testet i oppgaven) viste ingen eller liten hemming av TLN og PsE tyder på at det også er betydelige forskjeller i bindingslommene på det katalytiske setet, noe som kan brukes til utvikling av spesifikke TLN og PsE hemmere som ikke har, eller har minimal effekt på MMP.



#### 4.1. Enzymkinetikk

Først ble  $K_m$  for substratene bestemt ved eksperimentelle forsøk (figur 25).



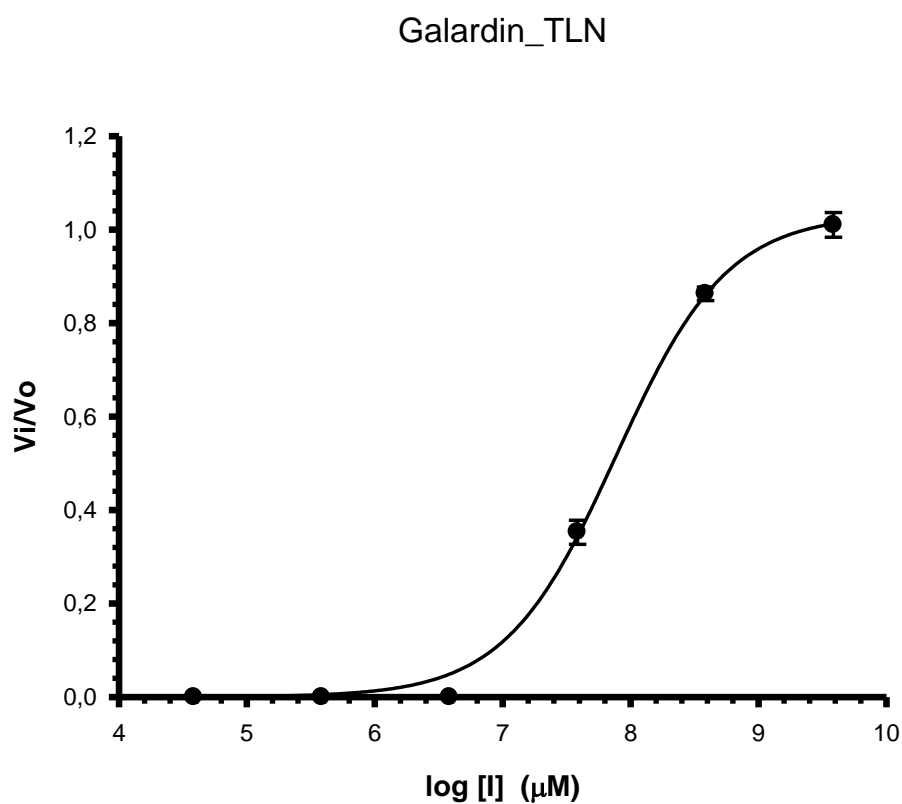
**Figur 25.** Michaelis-Menten kurve for PsE ved bruk av AGLA substrat er vist som eksempel. Kurven gir mulighet til å beregne  $K_m$  verdi for AGLA substrat mot PsE.

**Ved hjelp av Michaelis-Menten kurver og Enzym kinetikk program ble  $K_m$  verdier beregnet:**

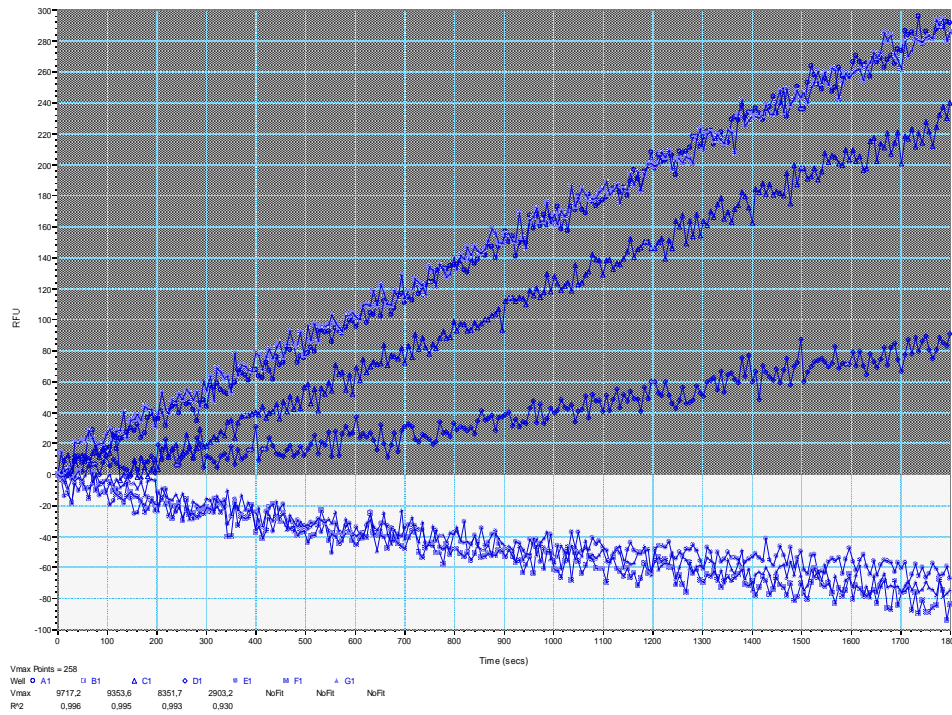
5. TLN og BLS  $K_m$  på  $17.7 \pm 4.3 \mu\text{M}$
6. PsE og BLS  $K_m$  på  $7.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$ ,
7. TLN og AGLA  $K_m$  målt til  $67.7 \pm 10.5 \mu\text{M}$ ,
8. PsE og AGLA  $K_m$  målt til  $124.8 \pm 22.9 \mu\text{M}$ .

## 4.2. Galardin

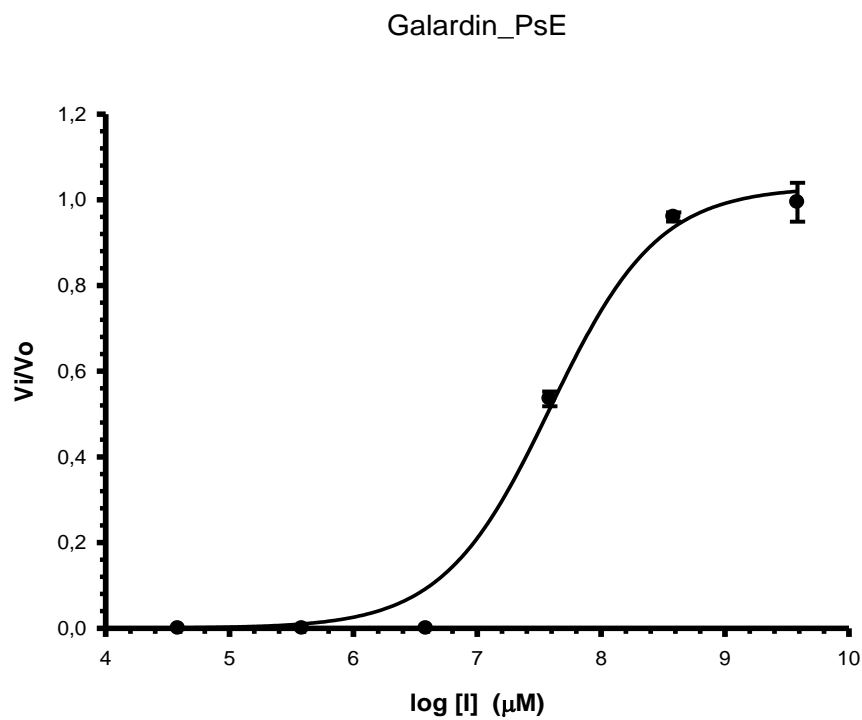
For å bekrefte at Spectra MAX fungerte som den skulle, og for å kartlegge hvor følsom den er i forhold til Elmer fluorometeret ble TLN og PsE testet mot Galardin som er en kjent hemmer med  $K_i$  på rundt 20 nM for begge enzymer.<sup>46</sup> Dermed var det ikke behov å lage standard kurve. Ved hjelp av Perkin Elmer Lambda 16 UV/VIS spektrofotometer ble en reelle Galardin konsentrasjon på 2.42 mM i frosne Ependorf rør beregnet. Resultatene viste forventet  $IC_{50}$  verdi på 12.2 nM for TLN og 24.3 nM for PsE ved bruk av BLS. Fra  $IC_{50}$  ble  $K_i$  verdi beregnet på 9.95 nM for TLN og  $K_i$  på 15.80 nM for PsE ved hjelp av ligning 15.



**Figur 26.** Figuren viser sigmoid dose-respons kurve for Galardin mot TLN ved bruk av BLS. Konsentrasjonene for Galardin er gitt i tabell 7.



**Figur 27.** Figuren gir eksempel på hvordan tidskurve for Galardin og PsE ser ut ved bruk av BLS.

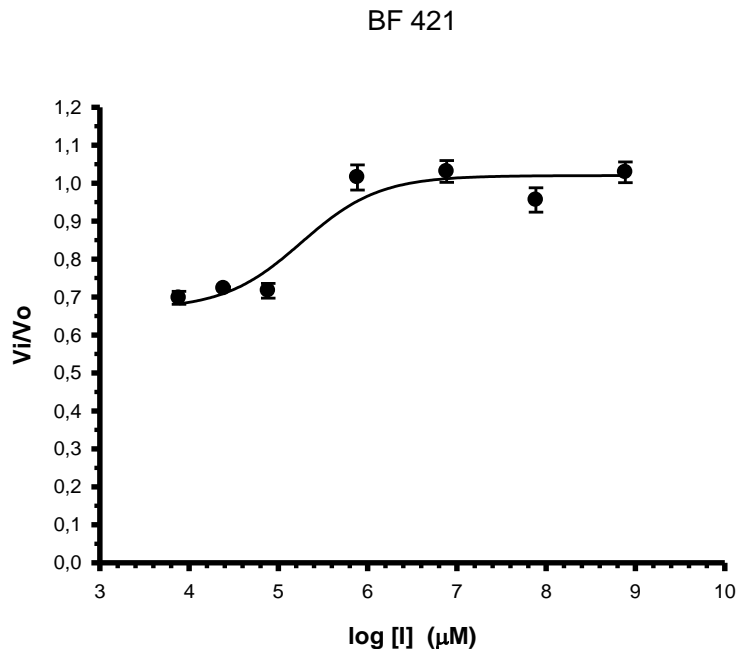


**Figur 28.** Figuren viser sigmoid dose-respons kurve for Galardin mot PsE ved bruk av BLS. Konsentrasjonene for Galardin er gitt i tabell 7.

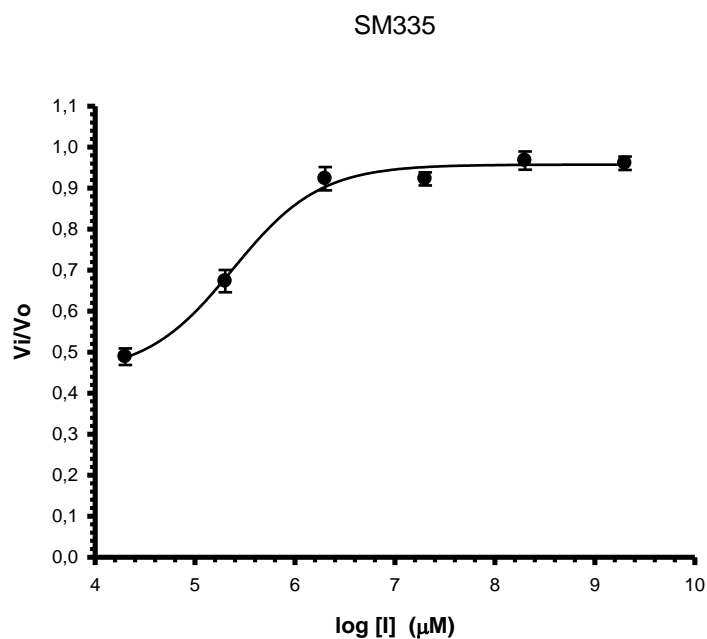
### 4.3. IC<sub>50</sub> verdier

IC<sub>50</sub> verdi beskriver bindingsaffinitet mellom hemmer og enzym. Enheten benevnes i molare konsentrasjoner, og desto mindre konsentrasjonen er desto sterkere er bindingen. Den indikerer hvor mange partikler av et hemmer man trenger in vitro for å hemme en enzymaktivitet med 50 %. Med andre ord forteller oss hvor potent en hemmer er mot et enzym. Til færre molekyler (lavere konsentrasjon) vi trenger for å redusere enzymaktivitet med 50 % desto sterkere er hemmingen. Figurene 24 -30 viser eksempler på dose-respons kurver som viser bindingsaffiniteten mellom enzymene og hemmerne. IC<sub>50</sub> verdi er oppsumert i tabell 8.

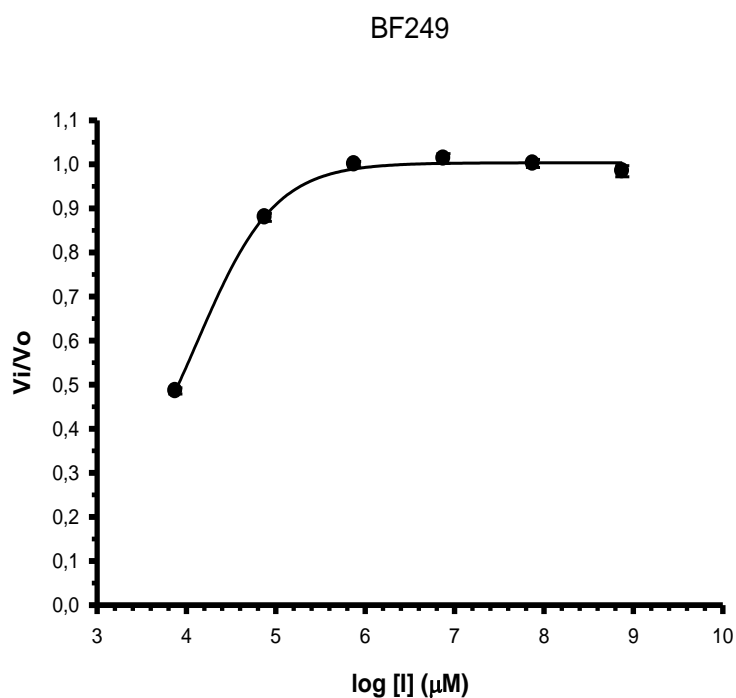
Ingen av forbindelser viste seg å være gode hemmerer mot enzymene TLN og PsE.



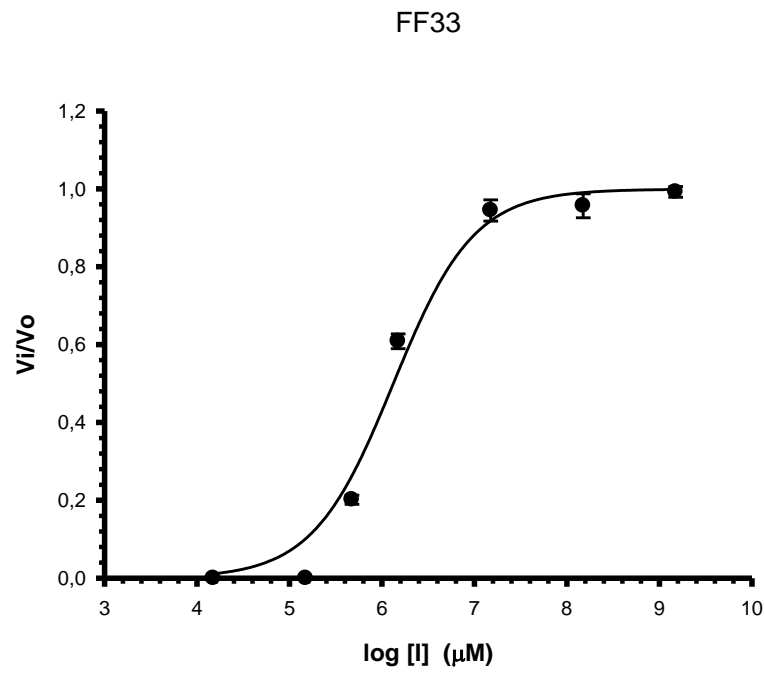
**Figur 29.** Figur viser sigmoid dose-respons kurve for forbindelse BF421. Enzym: TLN. Substrat: BLS. Hemmer konsentrasjoner ligger i region 1.30 nM – 130 µM. Grafen flater ut etter reduksjon i enzymaktivitet på cirka 30 % ved hemmer konsentrasjon rundt 10 -13 µM. Videre økning i hemmer konsentrasjon gir ikke økt hemming av enzymet.



**Figur 30.** Figuren viser sigmoid dose-respons kurve for SM335. Enzym: PsE. Substrat: BLS. Hemmer konsentrasjoner ligger i region 0.50 nM – 49.9 µM. Grafen flater ut ved reduksjon i enzymaktivitet på cirka 49 %, og videre økning i hemmerkonsentrasjon vil sannsynligvis ikke gi videre økning i hemming av enzymaktivitet.



**Figur 31.** Figuren viser sigmoid dose-respons kurve for BF249. Enzym: TLN. Substrat: BLS. Hemmer konsentrasjoner ligger i region 1.33 nM – 132.7 µM. Ved reduksjon i enzym aktivitet på cirka 51 %, kan grafen enten flate ut ved videre økning i hemmer konsentrasjonen som i figur 28 eller gå helt til 0 i verdi for  $V_i/V_o$ .  $IC_{50}$  ble beregnet til 122,49 µM om vi antar at økning i hemmer konsentrasjon fører til at grafen går til 0  $V_i/V_o$ .



**Figur 32.** Figuren viser sigmoid dose-respons kurve for FF33. Enzym: TLN. Substrat: BLS. Hemmer konsentrasjoner ligger i region 0.67nM – 66.8 µM. Grafen går helt til 0 verdi i Vi/Vo. IC<sub>50</sub> ble beregnet til 0.754 µM

**Tabell 8.** IC<sub>50</sub> verdier for TLN og PsE til forbindelser fra Dr. Christina Campestre laboratorium. Bradykinin lignende substrat (BLS) og AGLA ble brukt som substrater.

Forbindelser	Pseudolysin			Thermolysin	
	IC <sub>50</sub> (µM) #	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
	AGLA	AGLA	BLS	AGLA	BLS
ELE5`	9,4	-	> 62,8	> 627,6	> 62,8
FF34	> 162	> 810,7	> 81,1	> 810,7 (45 %)	> 81,1
FF33	0,7	5,28	2,28	1,8	0,754
MT260`	2,5	-	> 84,2	> 842,0 (37 %)	> 84,2
MT113	-	-	-	-	-
MT137	1,7	*	*	*	*
MT155`	5,6	-	> 55,2	> 551,6 (36 %)	> 55,2
VM19`	4,5	*	> 95,8 (10 %)	*	> 95,8
VDL22	4,6	*	> 61,57	*	> 61,57 (36 %)
MT152	-	-	> 89,3	>893,1 (40 %)	> 89,3
MT200	4,3	-	> 51,1	> 511,4 (36 %)	> 51,1 (20 %)
VDL29	-	*	> 68,7	*	> 68,7
VDL28`	57,3	-	> 63,5 (30 %)	> 634,7 (23 %)	> 63,5 (30 %)
MT176	>195	-	> 81,4	≈ 814,4 (49 %)	> 81,4 (25 %)
MT35	-	*	> 60,1	*	> 60,1
MT179	>100	-	> 58,8	> 587,7 (43 %)	> 58,8
PP170	>200	-	> 79,9	> 799,1(30 %)	> 79,9
PP173`	49	-	> 98,2 (10 %)	616,60	> 98,2
BF144	>185	-	> 132,5	>1330,0 (35 %)	> 132,5
BF243	>183,5	-	> 114,7	>1150,0 (40 %)	> 114,7
BF249	>186	-	> 133 (20 %)	207,06	122,49/75,27 <sup>1</sup>
BF252	199	-	> 71,2	> 711,7 (22 %)	> 71,2
BF255	>392	-	> 89,4	> 893,4 (31 %)	> 89,4
BF268	200	-	> 99,9 (10 %)	226,52	> 99,9 (28 %)
BF282	4,5	-	> 74,85	12,22	(4,95 <sup>a</sup> )/>62,6 (40 %) <sup>1</sup>
BF298`	8,2	-	> 54,8	> 547,9 (33 %)	> 54,8
BF17`	16,7	-	> 81,2	≈ 811,6 (50 %)	> 81,2
BF58`	96,9	-	> 88,1	> 881,4 (38 %)	> 88,1
BF16	>367	> 917,4	> 91,7	> 917,4 (35 %)	> 91,7
BF20	>379	> 948,4	> 94,8	> 948,4 (42 %)	> 94,8
BF66	>45	-	*	97,72	*
BF407	>198	-	> 133,2	1299,3	> 133,2
BF418	199	-	> 99,5	546,64	> 99,5
BF421	>183	-	> 130	752,14	5,51 <sup>b</sup>
SM335	-	-	44,75	> 499,4	> 49,9
SM321	-	-	> 50,9	> 508,9 (43 %)	> 50,9
SM233	-	> 453,3	> 45,3 (10 %)	> 453,3 (35 %)	> 45,3
SM323	-	> 559,1	> 55,9 (10 %)	> 559,1(36 %)	> 55,9 (10 %)
SM328	-	> 646,5	>64,7 (25 %)	> 646,5 (28 %)	> 64,7
SM319	-	-	> 35,9 (28 %)	> 359,0 (41 %)	> 35,9
SM433	-	212,3	> 64,7 (25 %)	≈ 646,5 (48 %)	> 64,7
SM434	-	16,66	9,21	313,40	> 47,5
SM153	-	-	> 45,7 (38 %)	>457,3 (39 %)	> 45,7 (10 %)
Galardin	-	-	0,2435	-	0,12203

# IC<sub>50</sub> (µM) - Verdier i kolonne er fra tidligere eksperimentelle forsøk utført av Dr. O. Adekoya (ikke publisert).

\* - Forbindelser som har sin egen fluorescens ved samme bølgelengde region som substratet slikt at det er vanskelig å bestemme nøyaktig IC<sub>50</sub> verdi. (%) – viser hvor mange prosent hemming man oppnår av den aktuelle forbindelsen ved en gitt konsentrasjon.

1 – indikerer at det er vanskelig å bestemme om grafen går til 0 eller vil flate ut tidligere.. Første konsentrasjon viser IC<sub>50</sub> verdi hvis man antar at grafen går til 0, mens andre konsentrasjon viser IC<sub>50</sub> verdi hvis man antar at grafen flater ut før.

'- markerer forbindelser som viste forskjell i IC<sub>50</sub> verdier for PsE med AGLA substrat mellom forsøk utført av Dr. O. Adekoya og resultatene i denne oppgaven.

Forskjellene i resultat mellom Dr. O. Adekoya og resultatene i denne studien (tabell 8) kan forklares ut fra at i denne oppgaven ble det brukt 100 % DMSO for å løse AGLA, mens O. Adekoya løste substratet i syre etterfulgt av en komplisert måte for å nøytralisere syren før målingene ble gjort. I denne oppgaven ble det også brukt plateleser, noe som ikke ble brukt av Dr. O. Adekoya.

**Tabell 9.** IC<sub>50</sub> verdiene for 8 utvalgte forbindelser fra samarbeidspartnere i Italia (professor Armando Rossello) (Tabell 4) mot TLN. To substrattyper ble også brukt her: Bradykinin lignende substrat (BSL) og AGLA substrat.

Forbindelse	Thermolysin		
	IC <sub>50</sub> (µM) ⌘⌘	IC <sub>50</sub> (µM) **	IC <sub>50</sub> (µM) **
	BSL	BSL	AGLA
EN 73	800 +/- 61	> 33,46 (3%)	415,53 +/- 0.06
F 09	32 +/- 1.5	28,42 +/- 0.06	29,81 +/- 0.03
CC 30	438 +/- 48	> 28,26 (9%)	90,01 +/- 0.06
ML 25	33 +/- 3.3	25,40 +/- 0.05	28,97 +/- 0.28
EN 204	608 +/- 97	> 30,00 (38%)	242,72 +/- 0.13
FC 107	160 +/- 97	> 59,11 (36%)	90,47 +/- 0.04
SM 26	160 +/- 31	>27,05 (0%)	252,41 +/- 0.03
SM 27	> 1 mM	> 37,91 (15%)	217,97 +/- 0.06

⌘⌘ - IC<sub>50</sub> verdier fra Stian Søli (ikke publisert)

\*\* - IC<sub>50</sub> verdier oppnådd i denne studien

(%) – er prosent reduksjon i enzymaktivitet ved gitt hemmer konsentrasjon



**Tabell 10.** IC<sub>50</sub> verdiene for 8 utvalgte forbindelser fra samarbeidspartnere i Italia (fra professor Armando Rossello) mot PsE. To substrater ble brukt: Bradykinin lignende substrat (BSL) og AGLA substrat.

Forbindelse	Pseudolysin		
	IC <sub>50</sub> (µM) ⌘⌘	IC <sub>50</sub> (µM) **	IC <sub>50</sub> (µM) #
	BSL	BSL	AGLA
EN 73	797,98 +/- 50.6	> 33,46 (12%)	57,0
F 09	160,645 +/- 14.43	78,94 +/- 0.11	37,0
CC 30	141,83 +/- 23.24	> 28,26 (28%)	49,0
ML 25	27,951 +/- 2.551	33,51 +/- 0.03	3,00
EN 204	226,395 +/- 17.24	> 30,00 (41%)	43,0
FC 107	225,22 +/- 27.06	> 59,11 (33%)	71,0
SM 26	276,31 +/- 18.07	> 27,05 (16%)	19,4
SM 27	336,016 +/- 33.67	> 37,91 (7%)	70,0

⌘⌘ - IC<sub>50</sub> (µM) verdier fra Stian Sjøli (Ikke publisert).

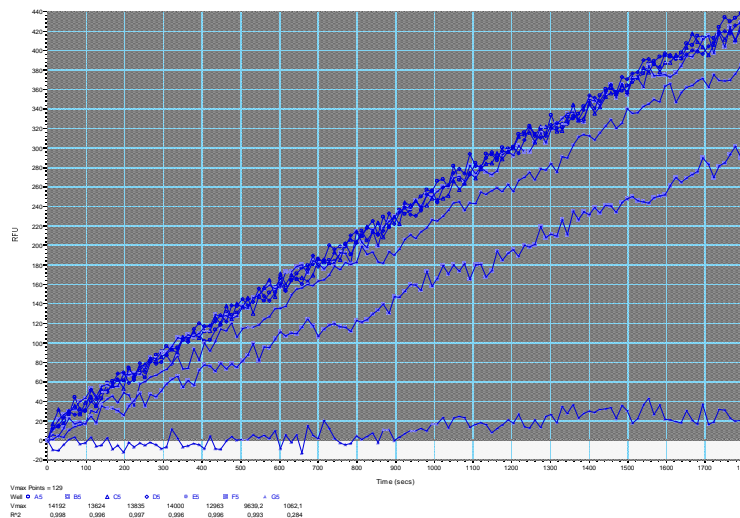
\*\* - IC<sub>50</sub> (µM) verdier oppnådd i denne studien.

# - IC<sub>50</sub> (µM) verdier fra Dr. O. Adekoya O.

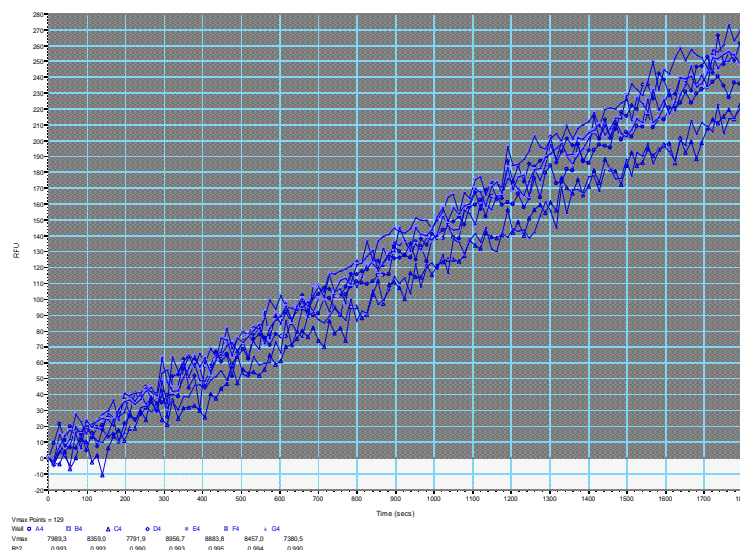
(%) – er prosent reduksjon i enzymaktivitet ved gitt hemmer konsentrasjon

Tabeller 9 og 10 viser IC<sub>50</sub> verdier for forbindelser fra professor A.Rosello. Resultatene er fra tre uavhengige eksperimentelle studier. Sjøli og Adekoya har også sett på en del av de samme forbindelsene som i denne oppgaven. Igjen ser man at resultatene fra denne oppgaven avviker fra Adekoya sine. Resultatene er like når hemmerne har IC<sub>50</sub> < 100 µM (forbindelser F 09 og ML 25 i begge tabeller). For svake hemmere (resten av forbindelser i tabeller 9 og 10), med IC<sub>50</sub> verdi > 100 µM er det forskjeller. Det er veldig sannsynlig at valg av substrat og buffersammensetting spiller en vesentlig rolle. En forklaring kan være at når sterke hemmer bindes til enzym så vil det være vanskeligere for substratet å utkonkurerer hemmer når vi har en kompetitiv hemming. For sterke hemmere er muligens valg av substrat derfor ikke så viktig. En ligende tendes ser vi også i tabell 8. Forbindelser FF 33 viser IC<sub>50</sub> verdi tilnærmet i samme region uansett valg av substrat, og det samme gjelder også for SM 434. Resten av forbindelse i tabellen er ekstrem svake hemmere og IC<sub>50</sub> verdi varierer med valg av substrat.

Enkelte forbindelser som ikke viste hemmende effekt mot TLN har en svak hemmende effekt mot PsE ved de høyeste konsentrasjonene i fortynningsrekka. Dette gjelder forbindelser i gruppe SM i tabell 8. Alle forbindelser i gruppen har samme grunnstruktur, og alle er derivater av fosfater. Forskjellen ligger i substituenten på den første (nærmest til fosfat gruppe) benzen ringen i para-posisjon. Forbindelse SM 434, som viste best effekt, har Brom i para-posisjon på benzen ringen. Dette er forskjellig fra andre forbindelser i gruppen som har ringstrukturer koplet til benzen ringen i stedet for Brom. Forbindelsene med ringstruktur blir mye større og "bulkete" molekyler, som viser seg å bli dårligere hemmere av PsE (tabell 8).



**Figur 33.** Figuren viser tidskurve for SM434 mot PsE ved bruk av BLS. Alle konsentrasjoner av hemmer i region fra 0.48 nM til 47.5  $\mu$ M er vist. (se verdier i tabell 8 og figur 53 viser mulig påsijon på aktiv sete)



**Figur 34.** Figuren viser tidskurve for SM434 mot TLN ved bruk av BLS. Alle konsentrasjoner av hemmer i region fra 0.48 nM til 47.5  $\mu$ M er vist.

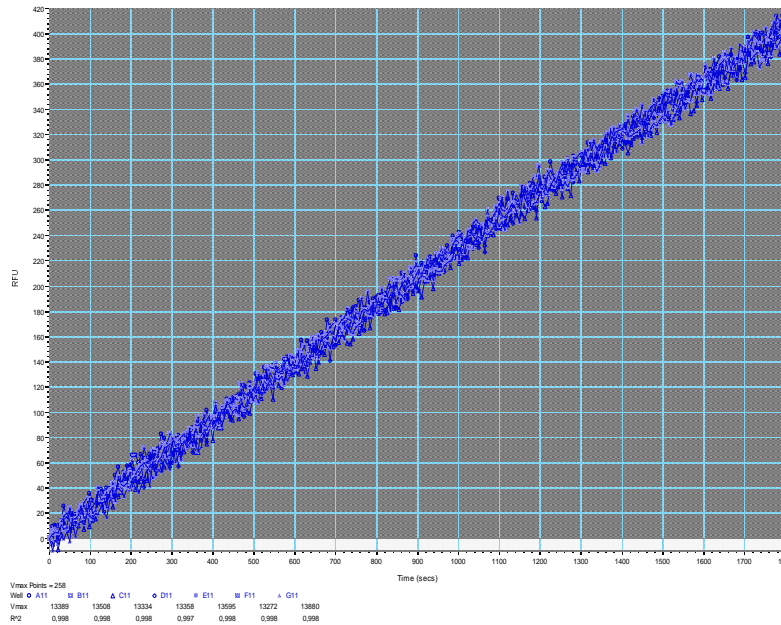
Et annet interessant funn var at enkelte forbindelser har sin egen fluoresens og/eller emisjon i samme bølgelengde som substratene. Det var ikke mulig å beregne  $IC_{50}$  verdi for disse forbindelsene når AGLA eller BLE brukes som substrat. Eksempel på slike forbindelser (strukturen vist i figur 22) er MT 137 hvor vi ikke kan beregne  $IC_{50}$  verdi ved konsentrasjoner over 50  $\mu M$  for begge substrater. VM19, VDL 22, VDL 29 og MT 35 har samme grunnstruktur og alle har fosfat Zn-bindende grupper, og resultatene viser at vi ikke kan beregne  $IC_{50}$  verdi mot AGLA substrat, mens for BF 66 kan vi ikke beregne  $IC_{50}$  verdi mot BLS. Resultater er gitt i tabell 8.

For å kunne kartlegge grundigere dette problemet, burde det vært kjørt fluoresenskurver for hver av disse forbindelsene alene. Dette er ikke gjort i oppgaven. Begge substratene eksiterer omtrent ved samme bølgelengde 330 nm for AGLA og 328 for BLS, mens emisjon bølgelengden er forskjellig, 460 nm for AGLA og 393 nm for BLS. Det er klart at alle forbindelser eksiterer i omtrent samme bølgelengde region. Dette kan forklares ut fra strukturen til forbindelser. Alle nevnte molekylstrukturene har bisykliske aromatiske deler i strukturen som absorberer lys. Eksitasjon av et av  $\pi$ -elektroner i en dobbeltbinding ligger nært 180 nm i bølgelengde, men når vi har flere konjugerte dobbeltbindinger i et molekyl begynner systemet å absorbere lys ved lengre bølgelengder og med sterkere intensitet. Derfor kan det at overnevnte forbindelser absorberer lys ved en relativt høy bølgelengde som 330 nm forklares.<sup>65</sup>

BF 66 viste seg å ha lavere emisjon enn de andre nevnte forbindelsene. Det er vanskelig å si hvorfor. Alle forbindelser er kompliserte strukturer. Men BF 66 er den eneste av forbindelsene som har en trippelbinding til N i strukturen (se figur 22). Forbindelse MT137 har en Cl ion i para-posisjon på en av benzenringene. Cl er en sterk elektrofil. Den mangler bare et elektron for å bli inert (stabil), og dette elektronet deler Cl med benzen ringen. Dette er mulig på grunn av  $\pi$ -elektroner (elektroner i  $\pi$ -orbitaler som overlapper hverandre og er perpendikulær til ringen) er delokalisert/jevnt fordelt mellom karbon kjernene over og under ringen for å oppnå mest stabil konformasjon. Delokalisering av dobbeltbindingene i benzen ringen og innvikring fra Cl-atomet gir opphav til flere resonans strukturer av MT 137 enn av forbindelsen VM 19 hvor Cl-atomet er lokalisert i orto-posisjon på benzen ringen. Cl-atomet i orto-posisjon trekker svakere på elektronene enn Cl-atom i para posisjon. Siden absorpsjon av synlig og UV lys danner forandringer i elektron energi av et molekyl assosiert med eksitasjon av et elektron fra en stabil til en ustabil orbital, så vet vi ikke hvordan lys påvirker disse resonansstrukturene. En annen årsak til egen fluoresens kan ligge i bufferen som forbindelsene ble fortynnet i. Både buffer 1 og 2 inneholder  $CaCl_2$ .  $CaCl_2$  kan danne ione-bindinger med enkelte av resonansstrukturene til disse forbindelsene. Dannelse av ione bindinger kan føre til dannelse av aggregater/komplekser som vi har ikke kontroll over, spesielt ved høye konsentrasjoner av hemmer forbindelser. Kompleksene kan emitere eller kan forstyrre lys gjennomstrømming, og dermed sabotere målingene.

#### 4.4. Maybridge forbindelser

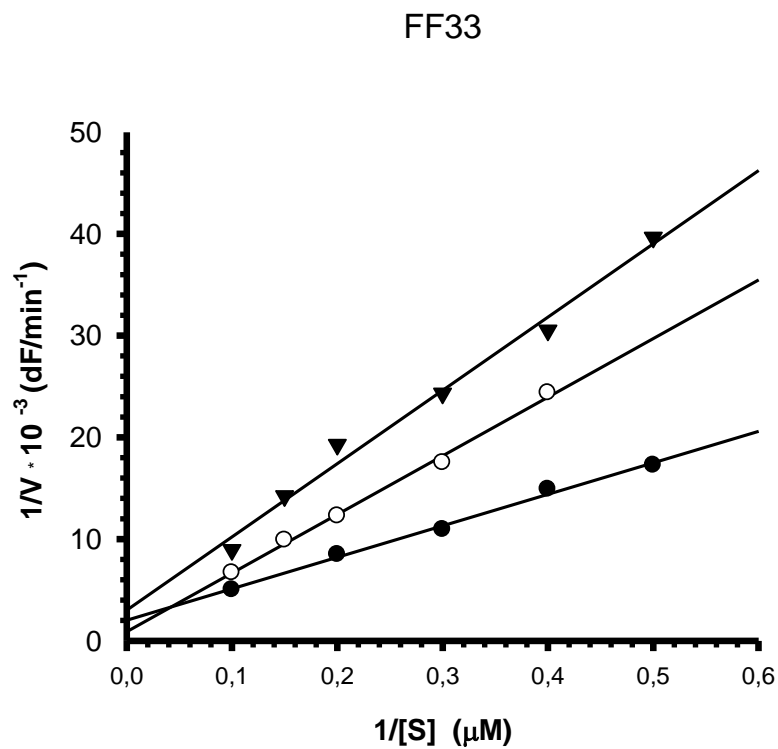
16 forbindelser fra Maybridge databasen ble kjøpt inn basert på en tidligere VS studie av Maybridge databasen (tabell 5, figur 24). Ingen av de 16 forbindelsene viste hemmende effekt mot TLN og PsE ved de testede konsentrasjonene. Det ble utført 2-4 paralleller av hver forbindelse for hver konsentrasjon.



**Figur 35.** Figur viser tidskurve for forbindelse nr 12 fra Maybridge databasen. Alle konsentrasjonene er presentert. Ingen hemming ble observert og grafene ser tilnærmet like for alle 16 forbindelsene både mot TLN og PsE.

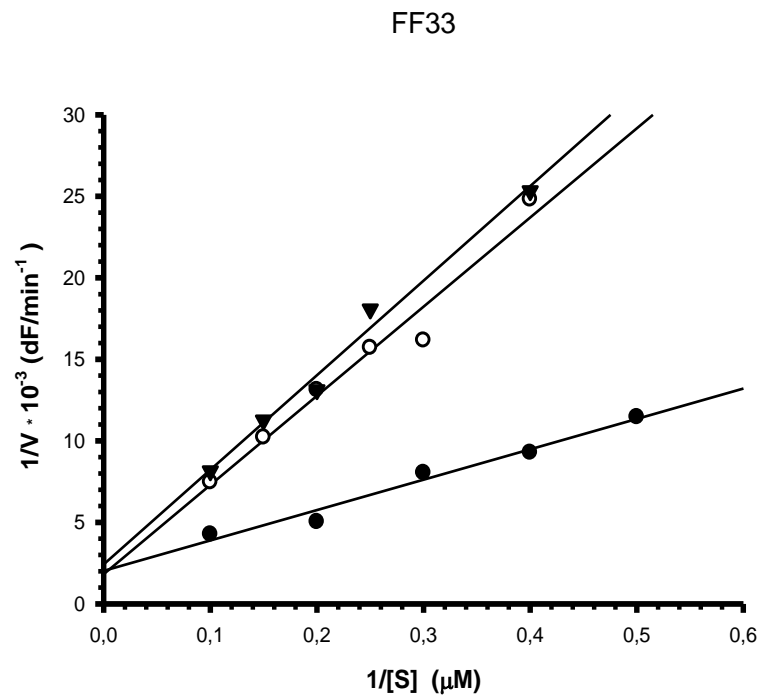
## 4.5. Enzymkinetikk

Forbindelser FF 33, BF 282, SM 434, viste seg å være kompetitive hemmere av TLN og PsE ved bruk av BLS og AGLA substrater. Forbindelse VDL 22 viste seg å være ukompetitiv hemmer for PsE ved bruk av BLS.



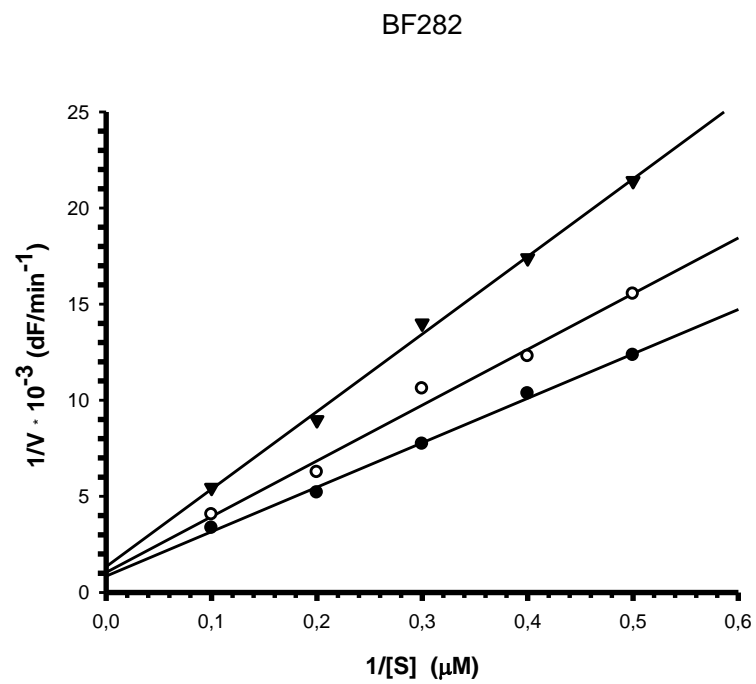
**Figur 36.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurve for FF33 mot TLN ved bruk av BLS.

(•) - standard kurve uten hemmer til stede, (o) – FF33 0.8 μM, (svart trekant) – FF33 1.8 μM.



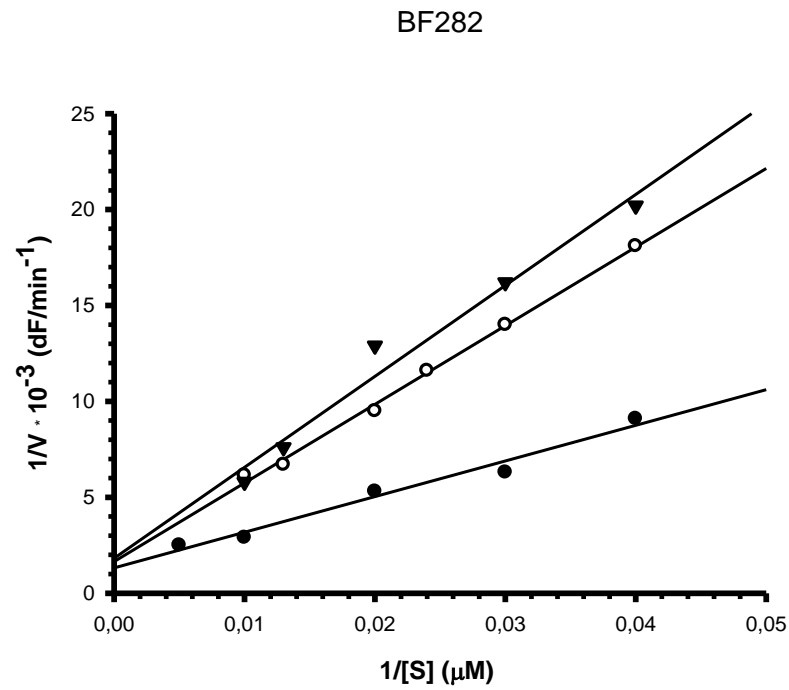
**Figur 37.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurve for FF33 mot PsE ved bruk av BLS.

(•) - standard kurve uten hemmer til stede, (o) – FF33 2.5  $\mu\text{M}$ , (svart trekant) – FF33 5.0  $\mu\text{M}$ .

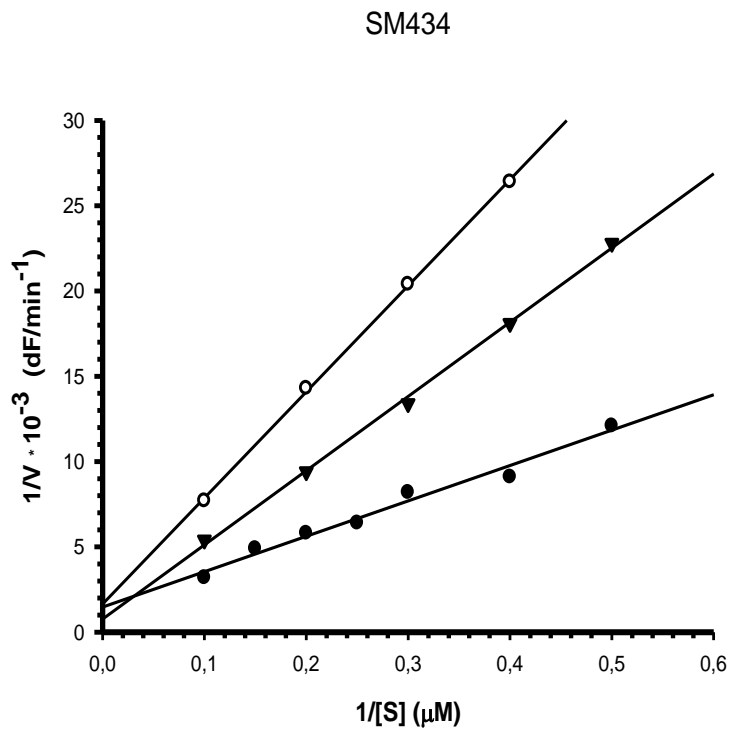


**Figur 38.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurve for BF282 mot TLN og ved bruk av BLS.

(•) - standard kurve uten hemmer til stede, (o) – BF282 13.0  $\mu\text{M}$ , (svart trekant) – BF282 26.0  $\mu\text{M}$ .



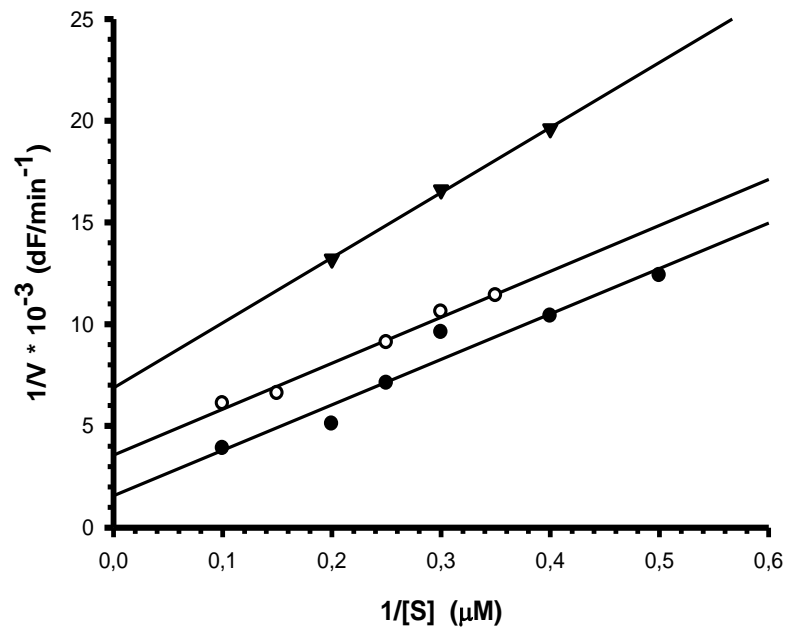
**Figur 39.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurver for BF282 mot TLN og ved bruk av AGLA. (•) - standard kurve uten hemmer til stede, (o) – BF282 13.0  $\mu\text{M}$ , (svart trekant) – BF282 26.0  $\mu\text{M}$ .



**Figur 40.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurver for SM434 mot PsE og ved bruk av BLS.

(•) - standard kurve uten hemmer til stede, (svart trekant) – SM434 5.0  $\mu\text{M}$ , (o) – SM434 10.0  $\mu\text{M}$ .

VDL22



**Figur 41.** Figur viser dobbelt reciprokale Lineweaver-Burk kurver for VDL22 mot PsE og ved bruk av BLS.

(•) - standard kurve uten hemmer til stede, (o) – VDL22 20.0  $\mu\text{M}$ , (svart trekant) – VDL22 30.0  $\mu\text{M}$ .

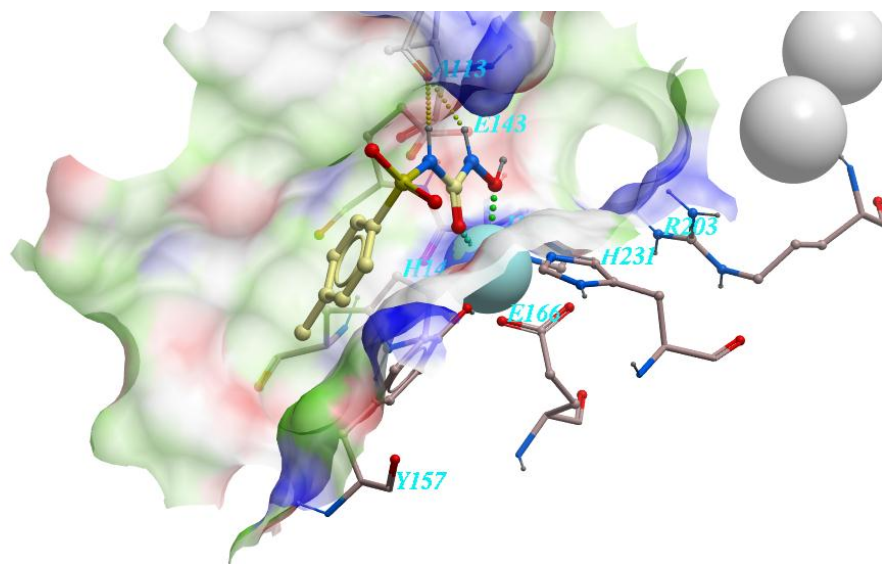


## 4.6. Dokking

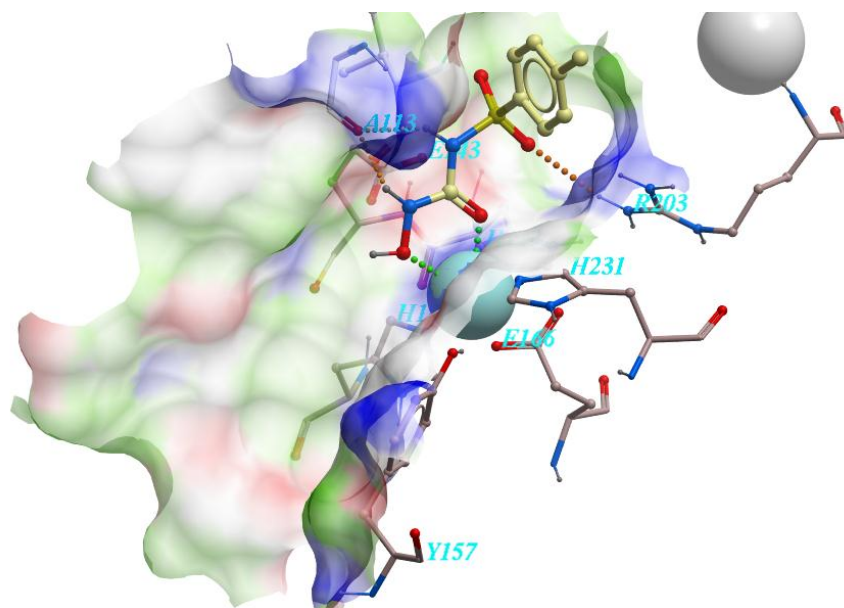
**Tabell 11.** Scoring verdier (kcal/mol) for dokking av forbindelser inn i det aktive setet av TLN og PsE. Verdiene er kalkulert ved å bruke molekylmodelleringsprogrammet ICM. 10 foreslåtte ligand-enzym komplekser for hver ligand ble analysert.

Compound	Scoring mot pseudolysin	Scoring mot thermolysin	Compound	Scoring mot pseudolysin	Scoring mot thermolysin
1 ELE5	-5.0	1.4	23 BF255	-19.0	-14.7
2 FF34	-14.7	-10.4	24 BF268	-20.8	-16.3
3 FF33	-19.8	-15.3	25 BF282	-17.4	-19.4
4 MT260	-8.4	-2.7	26 BF298	-18.9	-21.1
6 MT137	-5.9	0.7	27 BF17	-19.4	-12.3
7 MT155	-6.9	-0.2	28 BF58	-20.9	-15.4
8 VM19	-4.9	0.6	29 BF16	-17.2	-15.4
9 VDL22	-2.2	0.4	30 BF20	-21.0	-15.7
10 MT152	8.4	0.0	31 BF66	-10.8	-18.6
11 MT200	-2.8	0.4	32 BF407	-9.6	-3.8
12 VDL29	-8.8	-2.5	33 BF418	-11.6	-2.4
13 VDL28	-11.1	-10.1	34 BF421	-9.5	-1.0
14 MT176	4.4	8.4	35 SM335	2.2	11.5
15 MT35	-6.4	-2.1	36 SM321	6.8	11.9
16 MT179	-2.3	11.5	37 SM233	1.9	6.6
17 PP170	-32.6	-13.9	38 SM323	14.0	8.3
18 PP173	-30.7	-13.7	39 SM328	20.2	4.1
19 BF144	-21.1	-15.9	40 SM319	16.4	10.5
20 BF243	-15.6	-14.7	41 SM433	17.5	10.2
21 BF249	-15.6	-15.2	42 SM434	-6.8	6.1
22 BF252	-16.8	-13.8	43 SM153	0.7	5.7

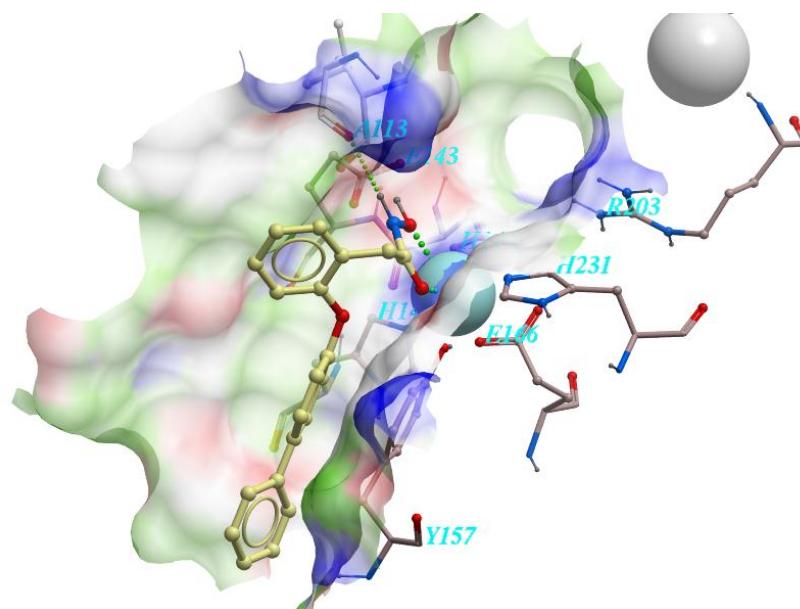
I dokking prosessen blir enzymets aktive sete for forbindelser. Dokkingen må derfor betraktes som et forenklet modellsystem. Under en kompleksering vil det skje forandringer i entalpi og entropi som den valgte dokkingmetoden ikke kan ta høyde for. Enzymene er ikke statiske strukturer og kan via små rotasjoner i peptid bindinger tilpasse seg til substrat/hemmer forbindelse. Ligandene har også i de fleste tilfeller flere roterende bindinger i strukturen. TLN og PsE består av to domener. Det er mulig at domenene roterer litt i forhold til hverandre dermed som enten kan fremme binding av en forbindelse eller motsatt frastøtte den. Det kan være en forklaring på hvorfor mange forbindelser som ved første blick har en ideell struktur for å kunne bli en god hemmer, men de eksperimentelle studiene viser at forbindelsen er en ekstremt svak hemmer. Det er mange forbindelser som ligner på hverandre blant de som ble testet i oppgaven. Flere hadde for eksempel en hydroksamat syredel i strukturen. Forbindelse BF 243 har likhetstrekk med Galardin men er mindre og antas derfor å komme lettere til enzymets aktive seter. Men forbindelse viste veldig svak hemming (tabell 8).



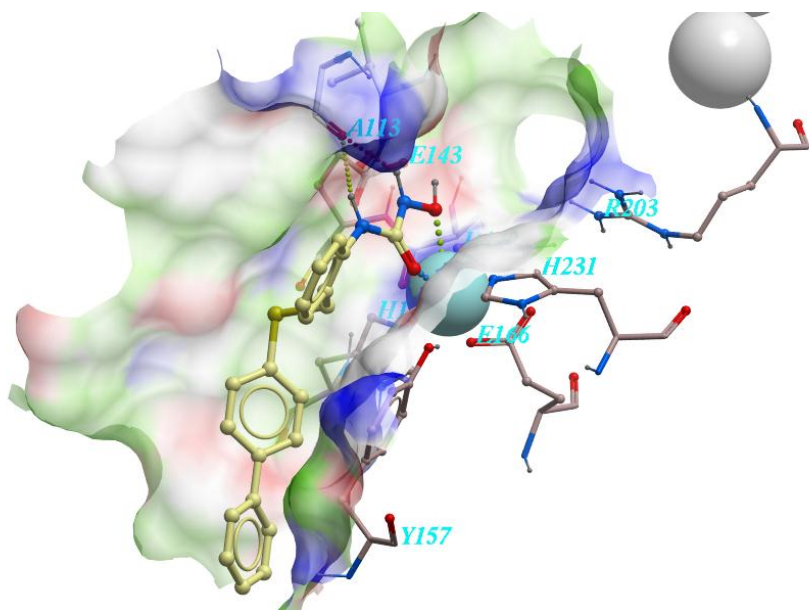
**Figur 42.** BF 243 i det aktive setet til TLN. Best foreslått posisjon. Scoring verdi er gitt i tabell 11. Figuren viser bidentate binding av begge oksygener fra hydroksomat delen av hemmer til katalytisk Zn. Forbindelse danner også 2 hydrogen bindinger med aminosyre Alanin 113. Vi ser mulig Van der Waals interaksjon mellom benzen ringen i forbindelsen og benzen ringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete.



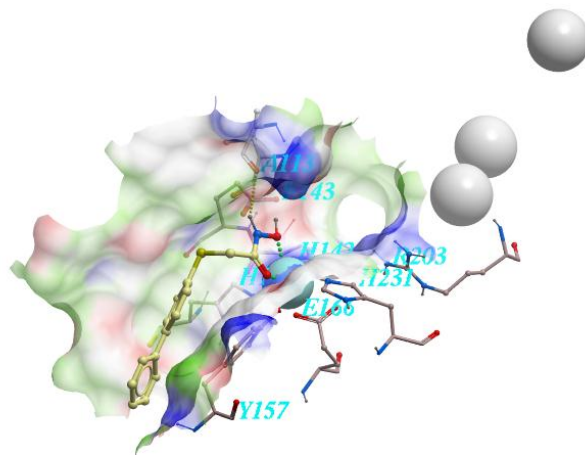
**Figur 43.** Figuren viser en alternativ posisjon av BF 243 mot TLN (posisjon 9 med scoring -5.614 kcal/mol). Figuren viser bidentat binding av begge oksygener fra hydroksammat delen av hemmer til katalytisk Zn. Her ser vi høyrevendt posisjon av hemmeren innenfor aktiv sete av TLN. Forbindelse i dette tilfelle danner en hydrogenbinding med Alanin 113 og et hydrogen binding med Arginin 203. Den store forskjell i scoring mellom samme forbindelse vist i posisjon på figuren 41 kan skyldes blant annet fravær av Van der Waals interaksjonen mellom benzen ringen og Tyrosin 157.



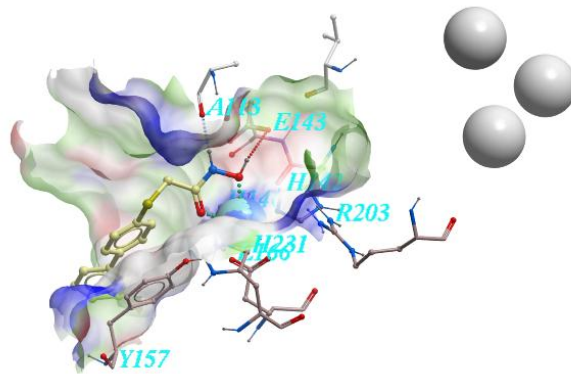
**Figur 44.** Forbindelse BF 282 i det aktive setet til TLN. Figuren viser konformasjonen som ICM foreslår som den beste. Scoring verdi er gitt i tabell 11. Figuren viser bidentat binding av begge oksygener fra hydroksammat delen av hemmer til katalytisk Zn og en hydrogenbinding med Alanin 113. Vi ser mulig Van der Waals interaksjon mellom benzen ringen i forbindelsen og benzen ringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete.



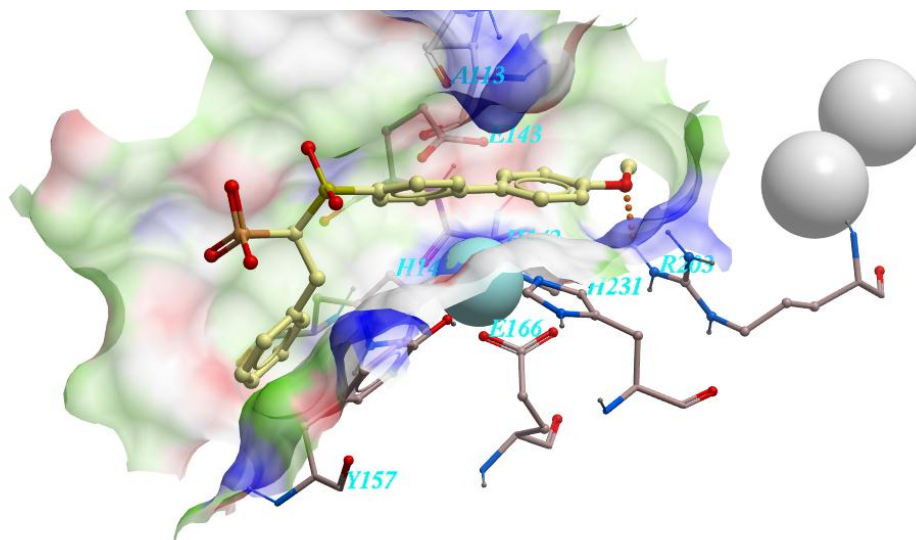
**Figur 45.** Forbindelse BF 298 i det aktive setet til TLN. Figuren viser konformasjonen som ICM foreslår som den beste. Scoring verdi er gitt i tabell 11. Figuren viser bidentat binding av begge oksygener fra hydroksammat delen av hemmer til katalytisk Zn og en hydrogenbinding med Alanin 113.



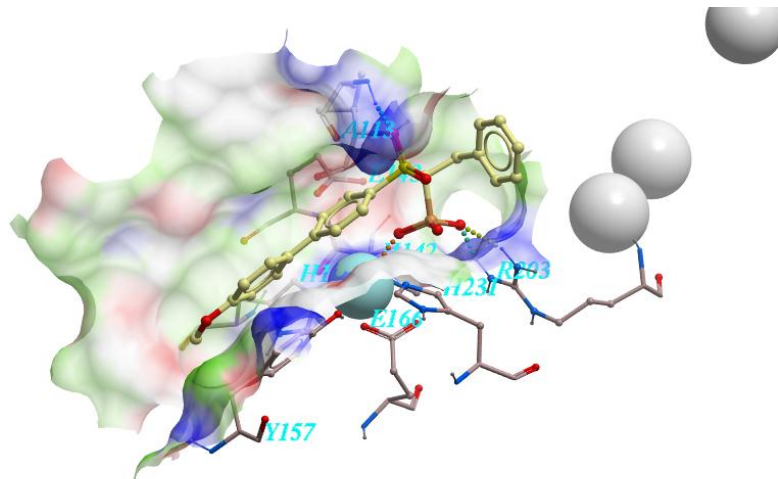
**Figur 46.** Forbindelse FF33 i det aktive setet til TLN. Figuren viser konformasjonen som ICM foreslår som den beste. Scoring verdi er gitt i tabell 11. Figuren viser bidentat binding av begge oksygener fra hydroksammat delen av hemmer til katalytisk Zn og en hydrogenbinding med Alanin 113. Vi ser mulig Van der Wals interaksjon mellom benzen ringen i forbindelsen og benzen ringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete.



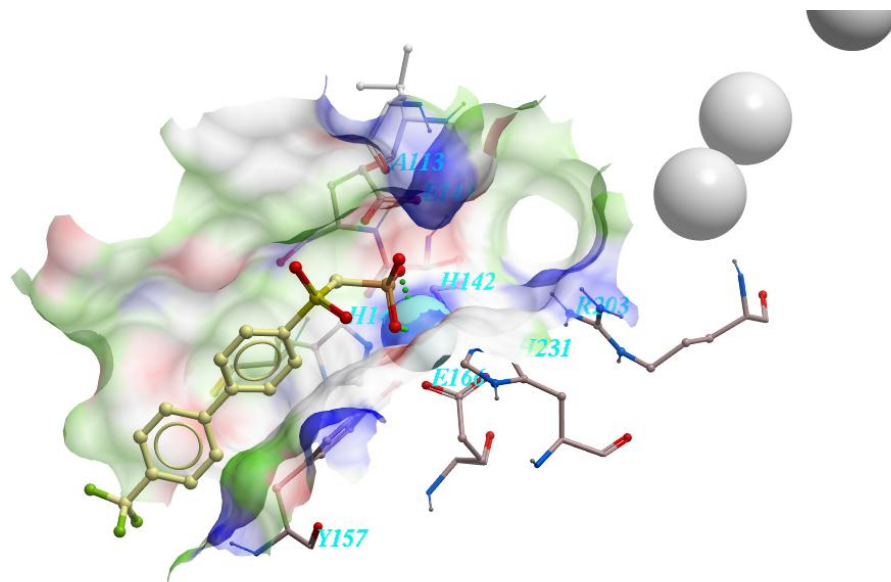
**Figur 47.** En alternativ posisjon av FF33 i det aktive setet til TLN. Denne dokking konformasjonen ble foreslått som den tredje beste av dokking programmet. Scoring verdi er -12.89 kcal.mol. Her kan observeres en ekstra hydrogen binding til aminosyre Glutamat 143 på TLN katalytisk sete. Posisjon mellom benzen ringene fra hemmer og Tyrosin 157 ser også til å være bedre, sammenlignet med figur 46 for å danne mulig Van der Wals interaksjon.



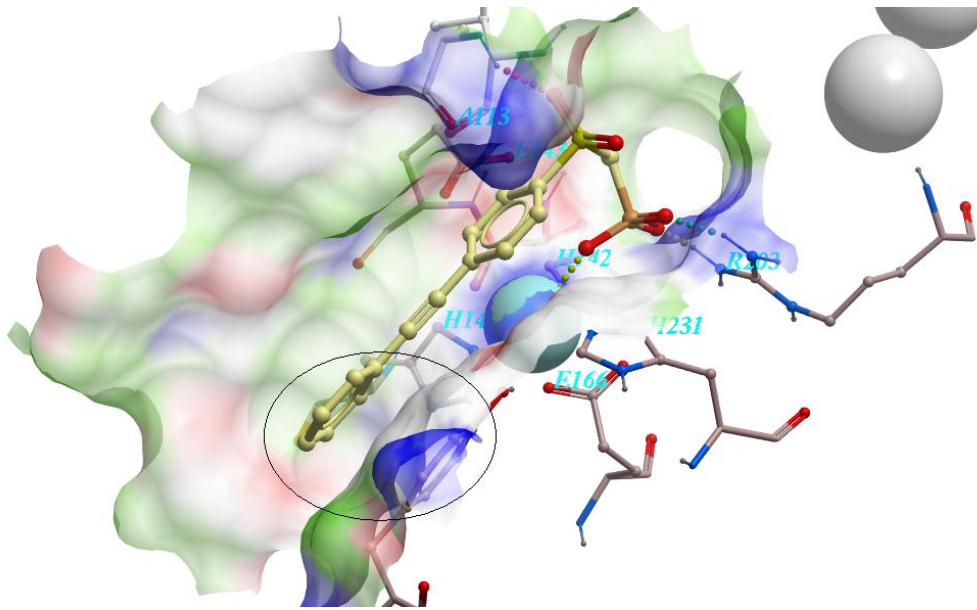
**Figur 48.** Forbindelse MT 35 i det aktive setet til TLN. Figuren viser konformasjonen som ICM foreslår som den beste. Scoring verdi er gitt i tabell 11. Koordinerer ikke direkte til Zn.



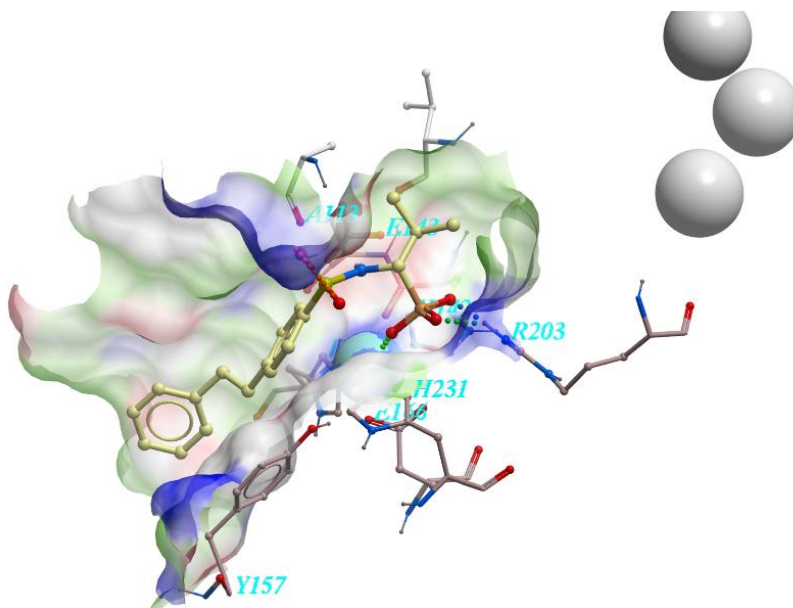
**Figur 49.** Alternativ posisjon av forbindelse MT 35 i det aktive setet av TLN. Figuren viser konformasjon 10 som har en veldig lav scoringverdi (+27.17 kcal/mol) til tross for at det er en direkte binding til Zn med den ene oksigenatomet fra fosfatgruppen. Vi ser mulig Van der Waals-interaksjon mellom benzenringen i forbindelsen og benzenringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete. Figuren viser en hydrogenbinding til Alanin 113 og hydrogenbindinger til aminosyre Arginin 203 mellom forbindelsen og det aktive setet av TLN.



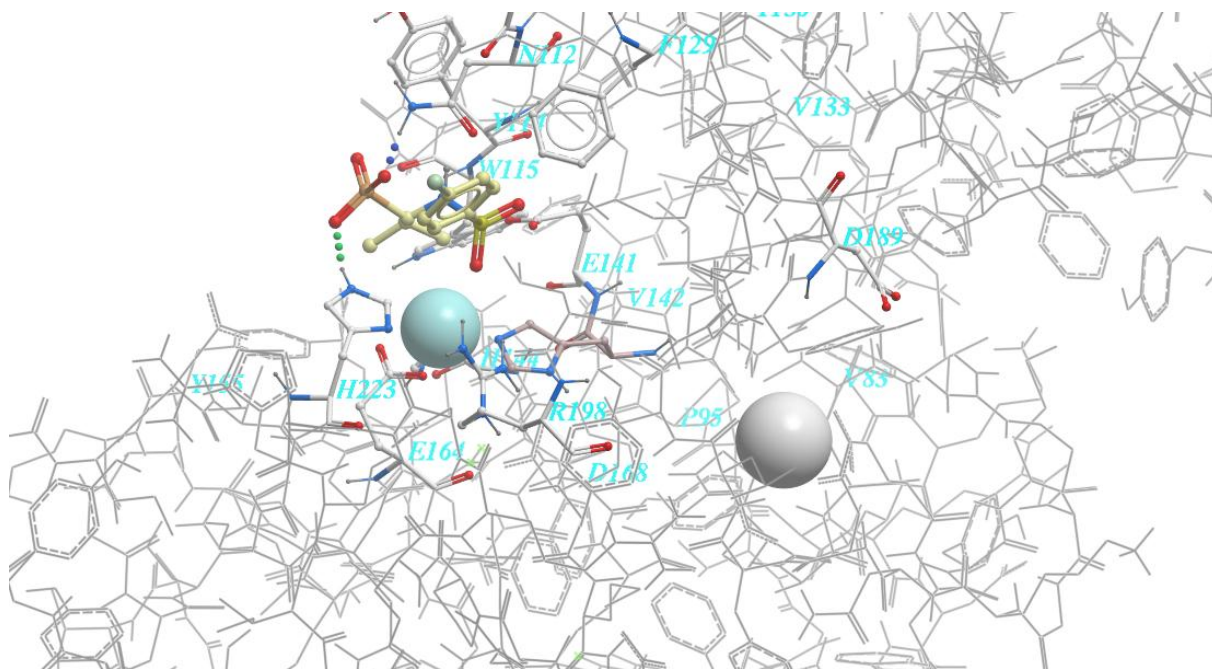
**Figur 50.** Forbindelse MT 155 i det aktive setet til TLN. Forbindelsen viste ingen hemmende effekt på TLN eller på PsE, men til tross for det så oppnådde forbindelsen en relativt god scoringverdi under docking med to oksygenatomer som binder Zn.



**Figur 51.** Forbindelse MT 200 i det aktive setet til TLN. Figuren viser posisjon nr 9 med scoringverdi på +17.24. Figuren tyder på mange interaksjoner mellom MT200 og TLN. Arginin 203, Zn, og Alanin 113 danner interaksjoner med liganden. Til tross for det er scoringverdien veldig lav. Vi ser mulig Van der Waals interaksjon mellom benzen ringen i forbindelsen og benzen ringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete. Forbindelsen hadde  $IC_{50}$  på over  $550 \mu\text{M}$  mot PsE og over  $55 \mu\text{M}$  mot TLN.



**Figur 52.** Forbindelse SM 335 i det aktive setet til TLN. Figuren viser posisjonen som ICM foreslår som den beste. Scoringverdien er gitt i tabell 11. SM 335 viser svak hemning mot PsE (tabell 8), men ikke for TLN til tross for direkte binding til Zn med den ene oksygen fra fosfat gruppe fra hemmeren.



**Figur 53.** Forbindelse SM 434 på det aktive setet til PsE. Forbindelsen har en god hemmning mot PsE, men ikke mot TLN. IC<sub>50</sub> er gitt i tabell 8 og scoringverdi i tabell 11. Dokking tyder på at forbindelsen ikke koordinerer Zn atomet til PsE. Figuren viser posisjonen som ICM foreslår som den beste. Her danner SM 434 hydrogenbindinger med aminosyrene Asparagine 112 og Tyrosine 155.

Dokking resultatene presentert i form av figurer viser en klar tendes. De som binder seg til det kataluysiske Zn-atomet danner også hydrogen binding(-er) til Alanin 113. Andre observasjon viser mulig Van der Wals interaksjon mellom benzen ringen i forbindelsen og benzen ringen fra aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete.

Forbindelsen SM 434 viste seg å være en brukbar PsE hemmer, men bare en svak TLN hemmer (tabell 8, figur 34). Dokking av forbindelsen inn i det aktive setet til PsE tyder på at SM 434 ikke koordinerer Zn-atomet på det aktive setet. Dette er en veldig interessant observasjon som kan være nyttig i "jaktten" på spesifikke hemmere. Alle Zn-metalloproteaser har et katalystisk Zn-atom på det aktive setet, og store strukturelle likheter i det Zn-bindende området. Det er derfor grunn til å tro at hemmere som ikke koordinerer Zn-atomet, men i stedet binder til sub-seter lokalisert utenfor det Zn-bindende området vil vise større spesifisitet.



## 5. Konklusjoner

Ingen av de 16 forbindelsene fra Maybridge database viste hemmende effekt mot TLN eller PsE ved de testede konsentrasjonene. De fleste forbindelse fra samarbeidspartnere i Italia viste seg å være ekstremt svake hemmerer (i følge våre resultater), noe som antas å være en av årsakene til at enkelte forbindelser viser varierende  $IC_{50}$  verdier ved bruk av de to substratene. Av totalt 50 forbindelser (42+8) fra samarbeidspartnere i Italia viste forbindelse FF33 en  $IC_{50}$  på 754 nM mot TLN og  $IC_{50}$  på 2.28  $\mu$ M mot PsE. Forbindelse VDL22 hadde en  $IC_{50}$  på 11,14  $\mu$ M mot TLN. Forbindelse SM434 viste seg å være en PsE hemmer med  $IC_{50} = 9.21 \mu$ M og  $K_i = 5.98 \mu$ M ved bruk av Bradykinin-lignende substrat. Dokking tydet på at denne forbindelsen ikke binder direkte til Zinc. Forbindelsene FF 33, BF 282, SM 434, viste seg å være kompetitive hemmerer for TLN og PsE, mens VDL 22 var en ukompetitiv hemmer for PsE ved bruk av Bradykinin lignende substrat.

Dokking resultater viste at hydrogen bindinger med Alanin 113 på TLN aktivt sete er viktig for binding av disse hemmerne. En benzen ring i struktur kan bidra til mulig Van der Wals interaksjon med aminosyre Tyrosine 157 på enzymets aktive sete. Dokkingstudiene tyder også på at store molekyler kan ha problemer med å binde seg til det aktive setet.

## 6. Feilkilder

- Kyvettene kan bli forurenset med for eksempel rester av syre.
- Buffer som enzymet er fortynnet i kan gi utslag ved målinger eller danne komplekser med hemmer forbindelse som kan påvirke resultatene.
- Forurensninger av instrumenter og preparater med tiden ved hyppig bruk (fluorometer, innholdsstoffer med flere).
- Feil ved pipettering, spesielt usikkerhet ved bruk av multipipetter.
- Mikrodråper av enzymet på utsidene av pipettespisser kan gi store utslag på måleresultater.
- Mange av de testede forbindelse har chirale senter og forefinnes i blanding. Vi har ingen kunnskap om hvilke streoisomere som er de mest aktiv. Dette vil kunne påvirke både de eksperimentelle studiene og dokkingen.
- Vannmolekyler ble fjernet fra enzymenes 3D struktur før dokking siden vi har liten kunnskap om deres bidrag til binding av inhibitorer. Dette kan ha påvirket dokking resultatene.

## 7. Videre arbeid

Oppgaven fører til en del spørsmål som burde vært undersøkt nærmere.

1. Mange av forbindelsene som ble testet har en eller flere kirale sentra men ble utlevert i en blanding av S og R konfigurasjoner. Hvis blanding av konfigurasjoner er 50/50 så kalles blandingen for racemisk mixtur. Det vi vet ikke hvor mye av hver form som finnes i de undersøkte blandingen, og vi vet ikke hvilken form som er mest aktiv. Dette kan påvirke både de eksperimentelle målingene og dokking studien. Slik som eksperimentene viste i andre studier med andre forbindelser har S og R konfigurasjoner, av enkelte hemmer, forskjellig affinitet til enzymene. Eksempel er en studie med Galardin hvor isomer 6B, med innvers konfigurasjon av  $\alpha$ -karbonet i forhold til isomer 6A, er sterk hydroxamat hemmer av TLN og PsE, mens isomer 6A har  $K_i$  femti gang større for samme enzymer enn 6B.<sup>46</sup> Hva om de forbindelser jeg har bestemt å være svake-moderate hemmerer for enzymene kan vise bedre hemmende effekt og høyere spesifisitet til enzymet hvis man får mulighet til å teste isomerene av disse forbindelser hver for seg, som ble gjort i studier med Galardin?

2. Sandra Rival et al. viser i sine kinetikkstudier av enzymatiske kondensasjoner ved bruk av to substrater samtidig, at binding av en substrat til en vis grad kan øke affinitet av TLN for den andre substratet.<sup>97</sup> Kan det være mulig at det eksisterer så kalte co-substanser med en vis affinitet til enzymet som kan ble mikset i assay med hemmer substansen og dermed øke affinitet av enzymet til aktuelle hemmer ved å binde seg først til andre steder på enzymet enn enzymets aktive sete?

3. Å finne gode og selektive hemmere av TLN og PsE har også vært tema for forskere i gruppen tidligere. Både O. Adekoya og Stian Sjøli har jobbet med en del av forbindelsene som også ble testet i denne oppgaven. Adekoya har brukt AGLA substrat i sine forsøk, mens Sjøli har brukt BLS slik som i denne oppgaven. Det viste seg at resultatene i denne oppgaven ble en del forskjellig fra Adekoya og Sjøli sine resultater, og det er også forskjeller mellom resultatene som Adekoya og Sjøli oppnådde. Hvis et substrat og en tett bindende hemmer konkurrer om samme sete på enzymets overflate så antas det at valg av substrat ikke vil påvirke resultatene i så stor grad. Hemmeren vil kunne bindes sterkt til enzymet i preinkuberingsfasen og forhindre binding av substrat, uansett hvilket substrat som ble brukt. Men hva hvis hemmeren er ikke sterk og ikke av typen tett bindende hemmer, hvordan kan valg av substrat i dette tilfelle komme til å påvirke resultatene?, eller hva om hemmeren er ikke kompetitiv? Kan det være at substratet påvirker affinitet av hemmer til enzym? Binde hemmer til et annet sted på enzymet enn substrat molekylet, og ved å forandre konformasjon på enzymet påvirkes dermed affiniteten av enzymet til substrat, og visa verso?

I denne oppgaven er det blitt gjort eksperimentelle forsøk som kan bidra til å forklare problemet eller kan være et grunnlag på å starte nye eksperimenter på en annenledes måte en det har blitt gjort her.

Takk for meg ☺

## 8. Referanser:

1. Copeland RA. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal.* 2005;46:1-265.
2. Groom CR, Hopkins AL. Protein kinase drugs--optimism doesn't wait on facts. *Drug Discov Today.* Aug 1 2002;7(15):801-802.
3. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* Sep 2002;1(9):727-730.
4. Nelson DL, Cox MM. Enzymes, Chapter 6. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4 nd. ed. New-York: W.H. Freeman and Company 2005:191-213.
5. MEROPS. Available at: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=M04.001;type=P>.
6. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* Jan 2008;36(Database issue):D320-325.
7. MEROPS. Available at: [www.merops.com](http://www.merops.com).
8. Khan MT, Sylte I. Determinants for psychrophilic and thermophilic features of metallopeptidases of the M4 family. *In Silico Biol.* 2009;9(3):105-124.
9. Matthews BW, Colman PM, Jansonius JN, Titani K, Walsh KA, Neurath H. Structure of thermolysin. *Nat New Biol.* Jul 12 1972;238(80):41-43.
10. Matthews BW, Jansonius JN, Colman PM, Schoenborn BP, Dupourque D. Three-dimensional structure of thermolysin. *Nat New Biol.* Jul 12 1972;238(80):37-41.
11. Matthews BW, Weaver LH, Kester WR. The conformation of thermolysin. *J Biol Chem.* Dec 25 1974;249(24):8030-8044.
12. Colman PM, Jansonius JN, Matthews BW. The structure of thermolysin: an electron density map at 2-3 Å resolution. *J Mol Biol.* Oct 14 1972;70(3):701-724.
13. Mansfeld J. Metalloprotease. In: A.P. MacCabe JPa, ed. *Industrial Enzymes p.:221-242; 2007.*
14. MEROPS. Available at: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/2dstru?id=M04>.
15. Smith AW, Chahal B, French GL. The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* has a gene encoding an enzyme first classified as a mucinase in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* Jul 1994;13(1):153-160.
16. Sahney NN, Summersgill JT, Ramirez JA, Miller RD. Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease. *J Med Microbiol.* Jun 2001;50(6):517-525.
17. Makinen PL, Clewell DB, An F, Makinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OG1-10). *J Biol Chem.* Feb 25 1989;264(6):3325-3334.
18. Holder IA. The pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa* using the burned mouse model: experimental studies from the Shriners Burns Institute, Cincinnati. *Can J Microbiol.* Apr 1985;31(4):393-402.
19. Komori Y, Nonogaki T, Nikai T. Hemorrhagic activity and muscle damaging effect of *Pseudomonas aeruginosa* metalloproteinase (elastase). *Toxicon.* Sep 2001;39(9):1327-1332.
20. Holder IA, Wheeler R. Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to *Pseudomonas aeruginosa*: elastase, an IgG protease. *Can J Microbiol.* Sep 1984;30(9):1118-1124.
21. Adekoya OA, Sylte I. The thermolysin family (M4) of enzymes: therapeutic and biotechnological potential. *Chem Biol Drug Des.* Jan 2009;73(1):7-16.
22. Sali A, Overington JP, Johnson MS, Blundell TL. From comparisons of protein sequences and structures to protein modelling and design. *Trends Biochem Sci.* Jun 1990;15(6):235-240.
23. Vandivier RW, Fadok VA, Hoffmann PR, et al. Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest.* Mar 2002;109(5):661-670.

24. Azghani AO, Miller EJ, Peterson BT. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*. 2000;178(5):261-269.
25. Schmidtchen A, Holst E, Tapper H, Bjorck L. Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog*. Jan 2003;34(1):47-55.
26. Thayer MM, Flaherty KM, McKay DB. Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *J Biol Chem*. Feb 15 1991;266(5):2864-2871.
27. Fontana A. Structure and stability of thermophilic enzymes. Studies on thermolysin. *Biophys Chem*. Feb 1988;29(1-2):181-193.
28. Roche RS, Voordouw G. The structural and functional roles of metal ions in thermolysin. *CRC Crit Rev Biochem*. 1978;5(1):1-23.
29. Dahlquist FW, Long JW, Bigbee WL. Role of Calcium in the thermal stability of thermolysin. *Biochemistry*. Mar 9 1976;15(5):1103-1111.
30. Holland DR, Hausrath AC, Juers D, Matthews BW. Structural analysis of zinc substitutions in the active site of thermolysin. *Protein Sci*. Oct 1995;4(10):1955-1965.
31. Matthews B. Structural Basis of the Action of Thermolysin and Related Zinc Peptidases. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ar00153a003>.
32. Hangauer DG, Monzingo AF, Matthews BW. An interactive computer graphics study of thermolysin-catalyzed peptide cleavage and inhibition by N-carboxymethyl dipeptides. *Biochemistry*. Nov 20 1984;23(24):5730-5741.
33. Mock WL, Aksamawati M. Binding to thermolysin of phenolate-containing inhibitors necessitates a revised mechanism of catalysis. *Biochem J*. Aug 15 1994;302 ( Pt 1):57-68.
34. Mock WL, Stanford DJ. Arazoformyl dipeptide substrates for thermolysin. Confirmation of a reverse protonation catalytic mechanism. *Biochemistry*. Jun 11 1996;35(23):7369-7377.
35. Pelmenschikov V, Blomberg MR, Siegbahn PE. A theoretical study of the mechanism for peptide hydrolysis by thermolysin. *J Biol Inorg Chem*. Mar 2002;7(3):284-298.
36. Toma S, Campagnoli S, De Gregoriis E, et al. Effect of Glu-143 and His-231 substitutions on the catalytic activity and secretion of *Bacillus subtilis* neutral protease. *Protein Eng*. Jan 1989;2(5):359-364.
37. Kubo M, Mitsuda Y, Takagi M, Imanaka T. Alteration of specific activity and stability of thermostable neutral protease by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*. Nov 1992;58(11):3779-3783.
38. Beaumont A, O'Donohue MJ, Paredes N, et al. The role of histidine 231 in thermolysin-like enzymes. A site-directed mutagenesis study. *J Biol Chem*. Jul 14 1995;270(28):16803-16808.
39. Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 20 1967;27(2):157-162.
40. de Kreij A, Venema G, van den Burg B. Substrate specificity in the highly heterogeneous M4 peptidase family is determined by a small subset of amino acids. *J Biol Chem*. Oct 6 2000;275(40):31115-31120.
41. Ligne T, Pauthe E, Monti JP, Gacel G, Larreta-Garde V. Additional data about thermolysin specificity in buffer- and glycerol-containing media. *Biochim Biophys Acta*. Jan 4 1997;1337(1):143-148.
42. Henrikson RL. Applications of thermolysin in protein structural analysis. *Methods Enzymol*. 1977;47:175-189.
43. Kidokoro S, Miki Y, Endo K, et al. Remarkable activity enhancement of thermolysin mutants. *FEBS Lett*. Jun 19 1995;367(1):73-76.
44. Kidokoro S. Design of protein function by physical perturbation method. *Adv Biophys*. 1998;35:121-143.
45. Matsumiya Y, Nishikawa K, Aoshima H, Inouye K, Kubo M. Analysis of autodegradation sites of thermolysin and enhancement of its thermostability by modifying Leu155 at an autodegradation site. *J Biochem*. Apr 2004;135(4):547-553.
46. Grobelny D, Poncz L, Galardy RE. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry*. Aug 11 1992;31(31):7152-7154.

47. Eijsink VG, Bjork A, Gaseidnes S, et al. Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol.* Sep 30 2004;113(1-3):105-120.
48. Van Den Burg B, Eijsink VG, Stulp BK, Venema G. One-step affinity purification of Bacillus neutral proteases using bacitracin-silica. *J Biochem Biophys Methods.* May 1989;18(3):209-219.
49. Wikipedia. Hydroxamic acid. Available at: [http://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxamic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxamic_acid).
50. Agrawal YK. Hydroxamic Acids and Their Metal Complexes *Russian Chemical Reviews.* Available at: [http://iopscience.iop.org/0036-021X/48/10/R03/pdf/0036-021X\\_48\\_10\\_R03.pdf](http://iopscience.iop.org/0036-021X/48/10/R03/pdf/0036-021X_48_10_R03.pdf).
51. Miller MJ. Syntheses and Therapeutic Potential of Hydroxamic Acid Based Siderophores and Analogues. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr00097a011>.
52. Jacobsen FE, Lewis JA, Cohen SM. The design of inhibitors for medically relevant metalloproteins. *ChemMedChem.* Feb 2007;2(2):152-171.
53. Wuxiuer Y. Theoretical and experimental studies of Thermolysin inhibition. Available at: <http://www.ub.uit.no/munin/bitstream/handle/10037/2034/thesis.pdf?sequence=1>.
54. Wikipedia. Michaelis-Menten kinetics. Available at: [http://en.wikipedia.org/wiki/Michaelis%E2%80%93Menten\\_kinetics](http://en.wikipedia.org/wiki/Michaelis%E2%80%93Menten_kinetics).
55. Enzymes. *Red River College.* Available at: <http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/enzymes.htm>.
56. Jakubowski D. Models of Enzyme inhibition. Available at: <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/transkinetics/olinhibition.html>.
57. Wikipedia. Available at: <http://www.google.com/search?hl=no&rls=com.microsoft%3Aano&biw=1079&bih=727&tbm=isch&sa=1&q=lineweaver+burke+uncompetitive+btnG=S%C3%B8k&aq=f&aqi=&aql=&og=995>>.
58. Paselk RA. Enzyme Kinetics, cont. . Available at: <http://users.humboldt.edu/rpaselk/C431.F07/C431Notes/C431nLec16.htm>.
59. Wikipedia. Available at: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Reversible\\_inhibition.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Reversible_inhibition.svg).
60. Copeland RA. Time-Dependent Inhibition, Chapter 10. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* Inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto: Wiley-VCH; 2000:pp. 318-349.
61. Copeland RA. Tight Binding Inhibitors, Chapter 9. *Enzymes : A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* Inc.: New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto,; Wiley-VCH,; 2000: pp 305-317
62. Forcella M, Cardona F, Goti A, et al. A membrane-bound trehalase from Chironomus riparius larvae: purification and sensitivity to inhibition. *Glycobiology.* Sep;20(9):1186-1195.
63. Winberg J-O. *laboratorie hefte, Øvelse 6 : Inhibition kinetics and molecular modelling.* Tromsø: Universitet i Tromsø; 2010.
64. Goldstein A. The Mechanism of Enzyme-Inhibitor-Substrate Reactions : Illustrated by the Cholinesterase-Physostigmine-Acetylcholine System. *J Gen Physiol.* Jul 20 1944;27(6):529-580.
65. S.Pedersen-Bjergaard. UV-spektroskopi, Kapitel 6. *Legemiddelanalyse.* Andre utgave ed. Bergen: Fagbokforlaget; 2010:pp. 93-108.
66. E.H.Kensal. Absorption and Emission of radiation, Chapter 8. *Physical Biochemistry.* Inc.: Englewood Cliffs, New Jersey; 1971:pp. 158-175.
67. Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins.* Oct 1 2006;65(1):15-26.
68. Jensen F, ed. *Optimization Techniques:* 2nd ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Sussex, 2007
69. Ha S, Andreani R, Robbins A, Muegge I. Evaluation of docking/scoring approaches: a comparative study based on MMP3 inhibitors. *J Comput Aided Mol Des.* Jul 2000;14(5):435-448.
70. Moitessier N, Englebienne P, Lee D, Lawandi J, Corbeil CR. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *Br J Pharmacol.* Mar 2008;153 Suppl 1:S7-26.
71. ICM<sup>TM</sup>. Available at: [www.molsoft.com](http://www.molsoft.com)
72. Abagyan R, Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J Mol Biol.* Jan 21 1994;235(3):983-1002.

73. Gani OA. Signposts of docking and scoring in drug design. *Chem Biol Drug Des.* Oct 2007;70(4):360-365.
74. G.Folkers DR, W.Sipl, H.-D. Holtje. Small molecules, Chapter 2. *Molecular Modeling.* third ed; 2008:pp. 74-75.
75. G.Folkers DR, W.Sipl, H.-D. Holtje. Small molecules, Chapter 5 and 6. *Molecular Modeling.* third ed; 2008:pp. 181-231.
76. Khan MT, Fuskevag OM, Sylte I. Discovery of potent thermolysin inhibitors using structure based virtual screening and binding assays. *J Med Chem.* Jan 8 2009;52(1):48-61.
77. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie.* Mar-Apr 2005;87(3-4):249-263.
78. Pochetti G, Gavuzzo E, Campestre C, et al. Structural insight into the stereoselective inhibition of MMP-8 by enantiomeric sulfonamide phosphonates. *J Med Chem.* Feb 9 2006;49(3):923-931.
79. Campestre C, Agamennone M, Tortorella P, et al. N-Hydroxyurea as zinc binding group in matrix metalloproteinase inhibition: mode of binding in a complex with MMP-8. *Bioorg Med Chem Lett.* Jan 1 2006;16(1):20-24.
80. Rubino MT, Agamennone M, Campestre C, et al. Synthesis, SAR, and biological evaluation of alpha-sulfonylphosphonic acids as selective matrix metalloproteinase inhibitors. *ChemMedChem.* Mar 2009;4(3):352-362.
81. Biasone A, Tortorella P, Campestre C, et al. alpha-Biphenylsulfonylamino 2-methylpropyl phosphonates: enantioselective synthesis and selective inhibition of MMPs. *Bioorg Med Chem.* Jan 15 2007;15(2):791-799.
82. Balakin KV, Savchuk NP, Tetko IV. In silico approaches to prediction of aqueous and DMSO solubility of drug-like compounds: trends, problems and solutions. *Curr Med Chem.* 2006;13(2):223-241.
83. Dimethyl sulfoxid. Available at: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl\\_sulfoxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide)>
84. Vignes R. "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) - A "New" Clean, Unique, Superior Solvent." PDF. *American Chemical Society Annual Meeting.* . 12.04.2010. Available at: <http://www.gaylordchemical.com/bulletins/vignes-acs.pdf>.
85. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007;368:39-57.
86. University C. Chemical Hygiene Plan. *Cornell University* <[http://en.wikipedia.org/wiki/Cornell\\_University](http://en.wikipedia.org/wiki/Cornell_University)>. 12.04.2010. Available at: <http://people.ccmr.cornell.edu/~cober/complete.chemical.hygiene.plan.2000.pdf>.
87. Yang JJ, Van Wart HE. Kinetics of hydrolysis of dansyl peptide substrates by thermolysin: analysis of fluorescence changes and determination of steady-state kinetic parameters. *Biochemistry.* May 31 1994;33(21):6508-6515.
88. PDB. Available at: [www.pdb.com](http://www.pdb.com)
89. Millipore. Available at: <http://www.millipore.com/catalogue/item/cc1100>.
90. Nishino N, Powers JC. Design of potent reversible inhibitors for thermolysin. Peptides containing zinc coordinating ligands and their use in affinity chromatography. *Biochemistry.* Oct 2 1979;18(20):4340-4347.
91. Kam CM, Nishino N, Powers JC. Inhibition of thermolysin and carboxypeptidase A by phosphoramidates. *Biochemistry.* Jul 10 1979;18(14):3032-3038.
92. Nishino N, Powers JC. Peptide hydroxamic acids as inhibitors of thermolysin. *Biochemistry.* Jul 11 1978;17(14):2846-2850.
93. Bartlett PA, Marlowe CK. Possible role for water dissociation in the slow binding of phosphorus-containing transition-state-analogue inhibitors of thermolysin. *Biochemistry.* Dec 29 1987;26(26):8553-8561.
94. Gaucher JF, Selkti M, Tiraboschi G, et al. Crystal structures of alpha-mercaptoacyldipeptides in the thermolysin active site: structural parameters for a Zn monodentation or bidentation in metalloendopeptidases. *Biochemistry.* Sep 28 1999;38(39):12569-12576.
95. Tronrud DE, Monzingo AF, Matthews BW. Crystallographic structural analysis of phosphoramidates as inhibitors and transition-state analogs of thermolysin. *Eur J Biochem.* Jun 2 1986;157(2):261-268.



96. Bartlett PA, Marlowe CK. Phosphoramidates as transition-state analogue inhibitors of thermolysin. *Biochemistry*. Sep 27 1983;22(20):4618-4624.
97. Rival S, Besson C, Saulnier J, Wallach J. Dipeptide derivative synthesis catalyzed by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Pept Res*. Feb 1999;53(2):170-176.

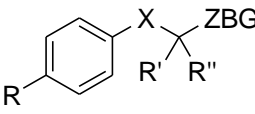
## 14. Appendix :

Det er ikke mulig å presentere hele spektr av resultater her. Mest interessante funn ble vist i oppgaven. Her viser jeg noen flere eksempler av målte verdier og noen graffer.

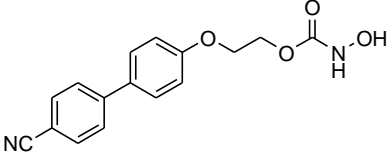
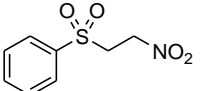
### A. TLN + BLS

Spektra MAX Gemini EM plateleser og svart costar 96 brønn plater med klar bunn ble brukt. Eksitasjon 328/10 nM, emisjon er 393/10 nM. Preinkubering 15 min ved 37 °C. Avlesing av reaksjonshastighet i 30 min ved 37°C etter substrat påsetting. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 4.376 nM (gir i brønn 0.21 nM), PsE - 6.67 nM (gir i brønn 0.33 nM), BSL - 20 µM (gir i brønn 4 µM). Fortynninger av enzym og substrat utført med buffer 1 (se tabell 6). Hemmer forbindelser (tabell 3,4 og 5) fortynnet med faktor 10 med buffer 2 (se tabell 6). Buffer 2 brukt som kontroll. Hjelpeplater og multipipetter ble brukt for påsetting av stoffer. Assay i hver kvette: 65 µl buffer 1 (se tabell 6), 20 µl substrat, 10 µl hemmer/buffer 2 (se tabell 6), 5 µl enzym. Rekkefølge for blanding: Buffer1→buffer 2→enzym→preinkubering→substrat. pH i forsøkene er 7.3.

#### Forbindelser av interesse for thermolysin (av Dr. Campestre)

							
Compound	R	R'	R''	X	ZBG	MW	Stokk Konsentr. mM
3 FF33	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	CONHOH	275.33	6,6829
6 MT137	(4-Cl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73	5,4221
9 VDL22	2-thienyl	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	318.31	6,1572
11 MT200	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )C≡C	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	336.31	5,1143

Compound	MW	Stokk Konsentr. mM
21 BF249	244.25	13,2651
24 BF268	292.31	9,9894
25 BF282	319.35	6,2627

31 BF66		298.29	7,5095
34 BF421		215.23	13,0093

<b>BF 421</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt konsen. I brønn på plate	Buffer 2	1,30 nM	13,0 nM	130 nM	1,30 µM	13,0 µM	41,1 µM	130 µM
V 1 parallell	12,972	12,657	11,386	12,793	11,957	8,9690	9,3737	8,6442
V 2 parallell	12,794	13,729	13,099	14,031	13,049	9,9015	9,3210	8,5753
V 3 parallell	14,501	14,313	13,522	14,198	15,108	10,033	10,551	10,567
V 4 parallell	14,272	15,391	14,118	15,146	15,364	10,114	10,165	10,362
Vi/Vo 1	1	0,9757	0,8777	0,9862	0,9218	0,6914	0,7226	0,6664
Vi/Vo 2	1	1,0731	1,0238	1,0967	1,0199	0,7739	0,7285	0,6703
Vi/Vo 3	1	0,9870	0,9325	0,9791	1,0419	0,6919	0,7276	0,7287
Vi/Vo 4	1	1,0784	0,9892	1,0612	1,0765	0,7087	0,7122	0,7260
Vi/Vo gjennomsnitt	1	1,03	0,96	1,03	1,02	0,72	0,72	0,70
Vi/Vo St. avvik	0	0,05	0,06	0,06	0,07	0,04	0,01	0,03

<b>FF33</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,67 nM	6,68 nM	66,8 nM	668 nM	2,11 µM	6,68 µM	66,8 µM
V 1 parallell	13,024	12,806	12,679	12,003	7,9072	2,5397	0	0
V 2 parallell	14,001	13,525	13,207	13,306	8,3892	2,4054	0	0
V 3 parallell	14,132	13,960	12,446	12,555	8,0301	3,0118	0	0
V 4 parallell	13,741	14,171	14,131	13,979	9,0601	3,1058	0	0
Vi/Vo 1	1	0,9833	0,9735	0,9216	0,6071	0,1950	0	0
Vi/Vo 2	1	0,9660	0,9433	0,9504	0,5992	0,1718	0	0
Vi/Vo 3	1	0,9878	0,8807	0,8884	0,5682	0,2131	0	0
Vi/Vo 4	1	1,0313	1,0284	1,0173	0,6594	0,2260	0	0
Vi/Vo gjennomsnitt	1	0,99	0,96	0,94	0,61	0,20	0	0
Vi/Vo St.avvik	0	0,03	0,06	0,05	0,04	0,02	0	0

<b>BF 249</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,33 nM	13,3 nM	133 nM	1,33 µM	13,27 µM	132,7 µM
V 1 parallell	8,0846	8,0095	7,8990	7,9921	7,8939	7,1273	3,7374
V 2 parallell	8,5825	8,5186	8,8458	8,8062	8,6628	7,5723	4,3142
V 3 parallell	8,8503	8,9224	8,8029	9,0793	8,9068	8,0115	4,3546
V 4 parallell	8,8255	8,7849	8,9441	9,1840	8,9141	7,7959	4,3448
V 5 parallell	9,6445	9,0251	9,5935	9,5042	9,6498	8,1779	4,6310
Vi/Vo 1	1	0,9907	0,9770	0,9886	0,9764	0,8816	0,4623
Vi/Vo 2	1	0,9926	1,0307	1,0261	1,0094	0,8823	0,5027
Vi/Vo 3	1	1,0082	0,9946	1,0259	1,0064	0,9052	0,4920
Vi/Vo 4	1	0,9954	1,0134	1,0406	1,0100	0,8833	0,4923
Vi/Vo 5	1	0,9358	0,9947	0,9855	1,0006	0,8479	0,4802
Vi/Vo Gjennomsnit	1	0,99	1,00	1,01	1,00	0,88	0,49

Vi/Vo St.avvik	0	0,03	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
-------------------	---	------	------	------	------	------	------

<b>BF 268</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,0 nM	9,99 nM	99,9 nM	999 nM	9,99 µM	99,9 µM
V 1 parallell	11,901	11,360	10,867	11,251	11,586	11,213	7,9886
V 2 parallell	11,962	12,358	12,236	12,618	12,461	11,776	8,3398
V 3 parallell	12,274	12,253	12,739	12,842	13,468	12,821	9,1897
V 4 parallell	12,791	12,850	13,396	13,516	13,626	13,421	9,5352
Vi/Vo 1	1	0,9545	0,9131	0,9454	0,9735	0,9422	0,6713
Vi/Vo 2	1	1,0331	1,0229	1,0548	1,0417	0,9845	0,6972
Vi/Vo 3	1	0,9983	1,0379	1,0463	1,0973	1,0446	0,7487
Vi/Vo 4	1	1,0046	1,0473	1,0567	1,0653	0,9732	0,7455
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	1,00	1,01	1,03	1,04	0,99	0,72
Vi/Vo St.avvik	0	0,03	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04

<b>BF 282</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,63 nM	6,26 nM	62,6 nM	626 nM	6,26 µM	62,6 µM
V 1 parallell	11,626	11,399	11,380	11,430	11,004	7,3755	4,1330
V 2 parallell	12,192	12,075	12,279	12,384	11,612	7,8486	5,2111
V 3 parallell	12,459	12,449	12,631	12,489	11,964	7,6331	4,8160
V 4 parallell	13,250	13,270	13,620	13,465	12,883	8,1508	5,3931
Vi/Vo 1	1	0,9805	0,9788	0,9831	0,9465	0,6344	0,3555
Vi/Vo 2	1	0,9904	1,0071	1,0158	0,9524	0,6438	0,4274
Vi/Vo 3	1	0,9992	1,0138	1,0024	0,9603	0,6127	0,3866
Vi/Vo 4	1	1,0015	1,0279	1,0162	0,9723	0,6152	0,4070
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	0,99	1,01	1,00	0,96	0,63	0,39
Vi/Vo St.avvik	0	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03

<b>MT 200</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,51 nM	5,11 nM	51,1 nM	511 nM	5,11 µM	51,1 µM
V 1 parallell	11,066	11,137	11,121	11,308	11,481	11,531	6,9279
V 2 parallell	11,766	12,721	12,530	13,001	12,244	12,733	7,8544
V 3 parallell	11,821	12,294	12,353	12,327	12,596	13,307	8,4569
V 4 parallell	10,572	11,582	12,125	12,472	12,328	12,545	8,5397
Vi/Vo 1	1	1,0064	1,0050	1,0219	1,0375	1,0420	0,6261
Vi/Vo 2	1	1,0812	1,0649	1,1050	1,0406	1,0822	0,6676
Vi/Vo 3	1	1,0400	1,0450	1,0428	1,0656	1,1257	0,7154
Vi/Vo 4	1	1,0955	1,1469	1,1797	1,1661	1,1866	0,8078
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	1,06	1,07	1,09	1,08	1,11	0,70
Vi/Vo St.avvik	0	0,04	0,06	0,07	0,06	0,06	0,08

<b>VD 22</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,62 nM	6,16 nM	61,6 nm	616 nM	6,61 µM	61,6 µM
V 1 parallell	11,607	11,249	12,151	11,940	12,078	12,076	7,3238
V 2 parallell	11,652	11,919	12,056	12,379	12,503	12,075	7,5719
V 3 parallell	11,859	12,404	11,978	12,435	12,372	12,123	7,7857
V 4 parallell	11,954	12,769	11,475	12,680	11,960	11,193	7,5991
Vi/Vo 1	1	0,9692	1,0469	1,0287	1,0406	1,0404	0,6310
Vi/Vo 2	1	1,0229	1,0347	1,0624	1,0730	1,0363	0,6498
Vi/Vo3	1	1,0460	1,0100	1,0486	1,0433	1,0223	0,6565
Vi/Vo 4	1	1,0682	0,9600	1,0607	1,0005	0,9363	0,6357
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	1,03	1,01	1,05	1,04	1,01	0,64
Vi/Vo St.avvik	0	0,04	0,04	0,02	0,03	0,05	0,01

**Forbindelser med "merkelige" graffer i forhpld til TLN + BLS. Sannsynligvis på grunn av egen fluorescens.**

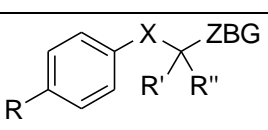
<b>MT 137</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,54 nM	5,42 nM	54,2 nM	542 nM	5,42 µM	54,2 µM
V 1 parallell	12,362	12,614	12,366	12,198	11,978	13,029	<b>- 4,042</b>
V 2 parallell	12,215	12,911	13,024	12,855	12,277	13,438	<b>5,2727</b>
V 3 parallell	12,938	12,360	13,175	12,610	12,254	13,596	<b>24,139</b>
V 4 parallell	13,171	13,096	13,072	13,451	12,707	13,176	<b>24,327</b>

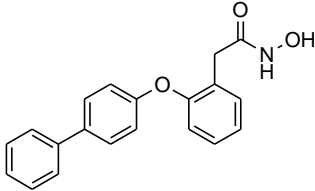
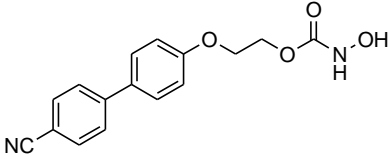
<b>BF 66</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,75 nM	7,51 nM	75,1 nM	751 nM	7,51 µM	75,1 µM
V 1 parallell	11,024	9,7743	8,9888	11,117	12,249	11,905	<b>15,863</b>
V 2 parallell	12,115	10,470	11,132	11,964	12,000	11,291	<b>2,0623</b>
V 3 parallell	12,022	11,401	12,013	12,434	12,826	13,206	<b>9,5037</b>
V 4 parallell	12,893	12,499	14,569	13,289	13,073	13,902	<b>42,436</b>

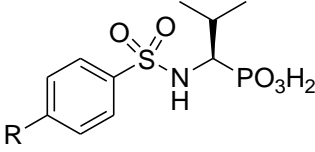
## B. PsE + BLS

Spektra MAX Gemini EM plateleser og svart costar 96 brønn plater med klar bunn ble brukt. Eksitasjon 328/10 nM, emisjon er 393/10 nM. Preinkubering 15 min ved 37 °C. Avlesing av reaksjonshastighet i 30 min ved 37 °C etter substrat påsetting. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 4.376 nM (gir i brønn 0.21 nM), PsE - 6.67 nM (gir i brønn 0.33 nM), BSL - 20 µM (gir i brønn 4 µM). Fortynninger av enzym og substrat utført med buffer 1 (se tabell 6). Hemmer forbindelser (tabell 3,4 og 5) fortynnet med faktor 10 med buffer 2 (se tabell 6). Buffer 2 brukt som kontroll. Hjelpeplater og multipipetter ble brukt for påsetting av stoffer. Assay i hver kyvette: 65 µl buffer 1 (se tabell 6), 20 µl substrat, 10 µl hemmer/buffer 2 (se tabell 6), 5 µl enzym. Rekkefølge for blanding: Buffer1→buffer 2→enzym→preinkubering→substrat. pH i forsøkene er 7.3.

### Forbindelser av interesse for Pseudolysin (av Dr. Campestre)

							
Compound	R	R'	R''	X	ZBG	MW	Stokk Kons. mM
3 FF33	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	CONHOH	275.33	6,6829
6 MT137	(4-Cl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73	5,4221
9 VDL22	2-thienyl	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	318.31	6,1572
15 MT35	(4-CH <sub>3</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	432.44	6,0124

25 BF282		319.35	6,2627
31 BF66		298.29	7,5095

			
Compound	R	MW	Stokk Konsentr. mM
35 SM335	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> cyclohexylamine salt	496.60	4,994
41 SM433	(3-Me)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	482.57	6,4654
42 SM434	Br cyclohexylamine salt	471.35	4,7523

<b>VD 22</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt konsen. I brønn på plate	Buffer 2	0,616 nM	6,16 nM	61,6 nM	616 nM	6,16 µM	61,6 µM
V 1 parallell	14,671	14,814	14,737	15,129	14,912	14,771	0,8152
V 2 parallell	14,972	14,750	14,984	14,358	15,421	14,993	1,079
V 3 parallell	13,677	14,459	14,863	15,205	15,917	15,070	0,7641
V 4 parallell	13,015	13,929	14,473	14,657	14,997	14,475	0,8287
Vi/Vo 1	1	1,0097	1,0044	1,0312	1,0164	1,0068	0,0556
Vi/Vo 2	1	0,9852	1,0008	0,9590	1,0300	1,0014	0,0721
Vi/Vo 3	1	1,0572	1,0867	1,1117	1,1638	1,1018	0,0559
Vi/Vo 4	1	1,0702	1,1120	1,1262	1,1523	1,1121	0,0637
Vi/Vo gjennomsnitt	1	1,0306	1,0510	1,0570	1,0906	1,0556	0,0618
Vi/Vo St. avvik	0	0,04	0,06	0,08	0,08	0,06	0,0078

<b>FF33</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,67 nM	6,68 nM	66,8 nM	668 nM	6,68 µM	66,8 µM
V 1 parallell	10,108	9,6907	9,6144	9,2379	7,4888	2,2611	0
V 2 parallell	9,4540	10,153	10,484	10,002	7,7369	2,0372	0
V 3 parallell	9,6007	9,2761	10,691	10,575	8,6838	2,2113	0
V 4 parallell	10,624	10,426	10,440	10,827	9,2701	2,9308	0
Vi/Vo 1	1	0,9587	0,9512	0,9139	0,7409	0,2237	0
Vi/Vo 2	1	1,0739	1,1089	1,0580	0,8184	0,2155	0
Vi/Vo 3	1	0,9662	1,1136	1,1015	0,9045	0,2303	0
Vi/Vo 4	1	0,9814	0,9827	1,0191	0,8726	0,2759	0
Vi/Vo gjennomsnitt	1	0,9951	1,0391	1,0231	0,8341	0,2364	0
Vi/Vo St.avvik	0	0,05	0,08	0,08	0,07	0,03	0

<b>SM 434</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,475 nM	4,75 nM	47,5 nM	475 nM	4,75 µM	47,5 µM
V 1 parallell	14,192	13,624	13,835	14,000	12,963	9,639	1,062
V 2 parallell	14,811	14,751	15,476	15,195	14,698	10,438	2,048
V 3 parallell	14,894	14,846	14,624	14,246	15,137	10,369	1,504
V 3 parallell	15,606	15,276	15,925	14,157	15,329	10,221	2,152
Vi/vo 1	1	0,9600	0,9748	0,9865	0,9134	0,6792	0,0748
Vi/Vo 2	1	0,9959	1,0449	1,0259	0,9924	0,7048	0,1383
Vi/Vo 3	1	0,9968	0,9819	0,9565	1,0163	0,6962	0,1010
Vi/Vo 4	1	0,9789	1,0204	0,9072	0,9823	0,6549	0,1379
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	0,9829	1,0055	0,9690	0,9761	0,6838	0,113
Vi/Vo St. avvik	0	0,02	0,03	0,05	0,04	0,02	0,03



<b>BF 282</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,63 nM	6,26 nM	62,6 nM	626 nM	6,26 µM	62,6 µM
V 1 parallell	15,425	14,746	14,478	15,709	11,214	14,841	8,1475
V 2 parallell	15,463	14,516	14,061	14,181	10,487	14,556	7,7846
V 3 parallell	15,588	15,332	15,008	16,261	11,002	13,972	7,8845
V 4 parallell	15,298	15,666	14,879	15,620	11,259	15,207	8,5733
Vi/Vo 1	1	0,9560	0,9386	1,0184	0,7270	0,9621	0,5282
Vi/Vo 2	1	0,9388	0,9093	0,9171	0,6782	0,9413	0,5034
Vi/Vo 3	1	0,9836	0,9628	1,0432	0,7058	0,8963	0,5058
Vi/Vo 4	1	1,0241	0,9726	1,0211	0,7360	0,9941	0,5604
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	0,9756	0,9458	0,9999	0,7118	0,9485	0,5245
Vi/Vo St.avvik	0	0,04	0,03	0,06	0,03	0,04	0,03

<b>SM 433</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,647 nM	6,47 nM	64,7 nM	647 nM	6,47 µM	64,7 µM
V 1 parallell	12,656	13,702	13,478	14,300	14,422	12,972	9,735
V 2 parallell	13,695	14,592	14,986	15,028	14,447	14,126	10,737
V 3 parallell	14,469	14,598	15,078	16,001	15,964	14,768	11,049
V 4 parallell	15,578	15,243	15,103	15,982	15,780	14,476	10,679
Vi/Vo 1	1	1,0826	1,0863	1,1299	1,1395	1,0250	0,7692
Vi/Vo 2	1	1,0655	1,0943	1,0973	1,0549	1,0315	0,7840
Vi/Vo 3	1	1,0089	1,0421	1,1059	1,1033	1,0207	0,7636
Vi/Vo 4	1	0,9785	0,9695	1,0259	1,0130	0,9293	0,6855
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	1,0339	1,0481	1,0898	1,0777	1,0016	0,7506
Vi/Vo St.avvik	0	0,05	0,06	0,05	0,06	0,05	0,04

<b>SM 335</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,499 nM	4,99 nM	49,9 nM	499 nM	4,99 µM	49,9 µM
V 1 parallell	13,966	12,817	13,750	13,067	13,596	10,177	6,214
V 2 parallell	14,934	14,755	13,452	14,170	14,465	10,460	7,401
V 3 parallell	16,119	15,351	15,910	14,975	13,854	10,635	7,651
V 4 parallell	15,927	15,675	15,870	13,962	14,185	9,613	8,608
Vi/Vo 1	1	0,9177	0,9845	0,9356	0,9735	0,7287	0,4449
Vi/Vo 2	1	0,9880	0,9008	0,9488	0,9686	0,7004	0,4956
Vi/Vo 3	1	0,9524	0,9870	0,9290	0,8595	0,6598	0,4747
Vi/Vo 4	1	0,9842	0,9964	0,8766	0,8906	0,6036	0,5405
Vi/Vo Gjennomsnitt	1	0,9606	0,9672	0,9225	0,9231	0,6731	0,4889
Vi/Vo St.avvik	0	0,03	0,04	0,03	0,06	0,05	0,04

**Forbindelser med "merkelige" grafer i forhold til PsE + BLS**

<b>MT 137</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,54 nM	5,42 nM	54,2 nM	542 nM	5,42 µM	54,2 µM
V 1 parallell	13,997	14,499	14,934	15,355	15,692	16,808	<b>19,157</b>
V 2 parallell	13,601	14,507	14,782	15,172	14,934	15,729	<b>16,683</b>
V 3 parallell	14,839	13,802	14,112	15,085	15,498	15,837	<b>15,712</b>
V 4 parallell	14,636	13,953	13,993	14,120	14,747	15,983	<b>20,444</b>

<b>BF 66</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,75 nM	7,51 nM	75,1 nM	751 nM	7,51 µM	75,1 µM
V 1 parallell	13,654	13,966	14,240	14,577	14,803	12,486	<b>20,216</b>
V 2 parallell	15,019	15,016	15,352	14,290	14,789	13,437	<b>18,137</b>
V 3 parallell	15,576	15,615	14,301	16,325	15,607	13,891	<b>-12,032</b>
V 4 parallell	15,996	15,866	16,972	16,910	16,427	15,027	<b>-30,751</b>

<b>MT 35</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Absolutt kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,601 nM	6,01 nM	60,1 nM	601 nM	6,01 µM	60,1 µM
V 1 parallell	14,653	14,739	14,910	15,211	15,054	13,992	<b>28,649</b>
V 2 parallell	15,167	15,301	15,466	15,852	15,603	13,895	<b>66,222</b>
V 3 parallell	14,725	15,215	15,802	15,671	15,966	15,280	<b>2,337</b>
V 4 parallell	17,503	17,119	15,913	17,414	17,400	15,052	<b>28,742</b>
V 5 parallell	14,933	15,159	1,106	15,804	15,966	16,093	<b>182,547</b>
V 6 parallell	14,493	14,181	16,103	16,251	16,060	16,373	<b>40,643</b>
V 7 parallell	16,847	16,963	16,545	17,049	16,814	17,356	<b>46,223</b>

## C. TLN + AGLA

Spektra MAX Gemini EM plateleser og svart costar 96 brønn plater med klar bunn ble brukt. Eksitasjon 330/10 nM, emisjon 460/10 nM. Preinkubering 15 min ved 37 °C. Avlesing av reaksjonshastighet ( $V_o$  og  $V_i$ ) i 30 min ved 37 °C etter substrat påsetting. Arbeidskonsentrasjoner: TLN - 4.376 nM (gir i brønn 0.21 nM), PsE - 6.67 nM (gir i brønn 0.33 nM), AGLA - 75  $\mu$ M (gir i brønn 15  $\mu$ M). Fortynninger av enzym og substrat utført med buffer 1 (se tabell 6). Hemmer forbindelser (tabell 3,4 og 5) ble fortynnet med faktor 10 med buffer 2 (se tabell 6). Buffer 2 brukt som kontroll. Hjelpeplater og multipipetter ble brukt for påsetting av stoffer. Assay i hver kvette: 65  $\mu$ l buffer 1 (se tabell 6), 20  $\mu$ l substrat, 10  $\mu$ l hemmer/buffer 2 (se tabell 6), 5  $\mu$ l enzym. Rekkefølge for blanding: Buffer1  $\rightarrow$  buffer 2  $\rightarrow$  enzym  $\rightarrow$  preinkubering  $\rightarrow$  substrat. pH i forsøkene var 7.3.

### Forbindelser av interesse for TLN (av Dr. Campestre)

<b>PP 173</b>	$V_o$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,98 nM	9,82 nM	98,2 nM	982 nM	9,82 $\mu$ M	98,2 $\mu$ M	981,7 $\mu$ M
V 1 parallell	8128.4	7544.7	6715.6	7535.5	7125.5	7510.3	6539.5	2713.2
V 2 parallell	9077.4	9211.5	7241.4	8054.4	7462.9	7962.1	7115.5	3223.8
$V_i/V_o$ 1	1.0000	0.92819	0.82619	0.92706	0.87662	0.92396	0.80453	0.33379
$V_i/V_o$ 2	1.0000	1.01477	0.79774	0.88730	0.82214	0.87713	0.78387	0.35515
$V_i/V_o$ gjennoms.	1.0000	0.97148	0.81197	0.90718	0.84938	0.90055	0.79420	0.34447
$V_i/V_o$ st. avvik	1.0000	0.06122	0.02012	0.02811	0.03852	0.03311	0.01461	0.01510

<b>BF 66</b>	$V_o$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,75 nM	7,51 nM	75,1 nM	751 nM	7,51 $\mu$ M	75,1 $\mu$ M	751,0 $\mu$ M
V 1 parallell	5591.3	5173.4	5312.0	5149.7	5491.9	5396.9	3225.1	0
V 2 parallell	6048.0	5528.0	5699.7	5948.4	5892.5	5682.6	3540.2	0
$V_i/V_o$ 1	1.0000	0.92526	0.95005	0.92102	0.98222	0.96523	0.57681	0
$V_i/V_o$ 2	1.0000	0.91402	0.94241	0.98353	0.97429	0.93958	0.58535	0
$V_i/V_o$ gjennoms.	1.0000	0.91964	0.94623	0.95228	0.97826	0.95241	0.58108	0
$V_i/V_o$ st.avvik	1.0000	0.00795	0.00540	0.04420	0.00561	0.01814	0.00604	0

<b>BF 249</b>	$V_o$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$	$V_i$
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,33 nM	13,3 nM	133 nM	1,33 $\mu$ M	13,3 $\mu$ M	133 $\mu$ M	1,32 mM
V 1 parallell	5822.1	4875.7	5722.1	5115.2	5658.8	5204.9	3359.9	550.67
V 2 parallell	5835.3	5855.6	5643.2	5428.9	5734.8	5351.6	3560.9	671.44
$V_i/V_o$ 1 parallell	1.0000	0.83745	0.98282	0.87858	0.97195	0.89399	0.57709	0.09458
$V_i/V_o$ 2 parallell	1.0000	1.00348	0.96708	0.93035	0.98278	0.91711	0.61023	0.11507
$V_i/V_o$ gjennoms.	1.0000	0.92047	0.97495	0.90447	0.97737	0.90555	0.59366	0.10483
$V_i/V_o$ st. avvik	1.0000	0.11740	0.01113	0.03661	0.00766	0.01635	0.02343	0.01449

<b>BF 268</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0,99 nM	9,99 nM	99,9 nM	999 nM	9,99 µM	99,9 µM	998,9 µM
V 1 parallell	9880.8	10257	9291.1	10076	9634.9	9524.1	6565.5	2555.0
V 2 parallell	10677	11082	9932.9	10443	10778	10161	6755.6	2254.3
Vi/Vo 1	1.0000	1.03807	0.94032	1.01976	0.97511	0.96390	0.66447	0.25858
Vi/Vo 2	1.0000	1.03793	0.93031	0.97808	1.00946	0.95167	0.63272	0.21113
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	1.03800	0.93532	0.99892	0.99229	0.95779	0.64860	0.23486
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.00010	0.00708	0.02947	0.02429	0.00865	0.02245	0.03355

<b>BF 407</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,332 nM	13,32 nM	133,2 nM	1,332 µM	13,32µM	133,2µM	1,33 mM
V 1 parallell	11250	10493	9734.2	10984	11204	10733	10194	4914.6
V 2 parallell	10585	10394	9574.7	10858	11053	10665	10049	5278.2
Vi/Vo 1	1.0000	0.93271	0.86526	0.97636	0.99591	0.95404	0.90613	0.43685
Vi/Vo 2	1.0000	0.98196	0.90455	1.02579	1.04421	1.00756	0.94936	0.49865
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	0.95734	0.88491	1.00108	1.02006	0.98080	0.92775	0.46775
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.03483	0.02778	0.03495	0.03415	0.03784	0.03057	0.04370

<b>BF 418</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,00 nM	9,95 nM	99,5 nM	995 nM	9,95 µM	99,5 µM	995,3 µM
V 1 parallell	10257	10064	10269	10212	11063	10596	9272.3	3645.6
V 2 parallell	10365	10590	10320	10502	11089	10824	9180.6	3562.8
Vi/Vo 1	1.0000	0.98118	1.00117	0.99561	1.07858	1.03305	0.90400	0.35543
Vi/Vo 2	1.0000	1.02171	0.99566	1.01322	1.06985	1.04428	0.88573	0.34373
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	1.00145	0.99842	1.00442	1.07422	1.03867	0.89487	0.34958
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.02866	0.00390	0.01245	0.00617	0.00794	0.01292	0.00827

<b>BF 421</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	1,30 nM	13,0 nM	130 nM	1,30 µM	13,0 µM	130 µM	1,30 mM
V 1 parallell	4450.9	5440.4	5599.5	5134.1	5570.6	5404.8	4864.5	1871.6
V 2 parallell	6278.8	5646.6	5803.7	5153.6	5750.9	5997.1	5287.1	1905.0
Vi/Vo 1	1.0000	1.22231	1.25806	1.15350	1.25157	1.21432	1.09293	0.42050
Vi/Vo 2	1.0000	0.89931	0.92433	0.82079	0.91592	0.95513	0.84206	0.30340
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	1.06081	1.09120	0.98715	1.08375	1.08473	0.96750	0.36195
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.22840	0.23598	0.23526	0.23734	0.18328	0.17739	0.08280

<b>BF 282</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0, 63 nM	6,26 nM	62,6 nM	626 nM	6,26 µM	62,6 µM	626,3 µM
V 1 parallell	5709.7	5553.2	5676.7	5705.3	5505.9	3328.8	1557.2	0
V 2 parallell	5763.7	5894.6	5926.1	5418.3	5566.6	3433.6	1513.5	0
Vi/Vo 1	1.0000	0.97259	0.99422	0.99923	0.96431	0.58301	0.27273	0
Vi/Vo 2	1.0000	1.02271	1.02818	0.94007	0.96580	0.59573	0.26259	0
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	0.99765	1.01120	0.96965	0.96506	0.58937	0.26766	0
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.03544	0.02401	0.04183	0.00105	0.00899	0.00172	0

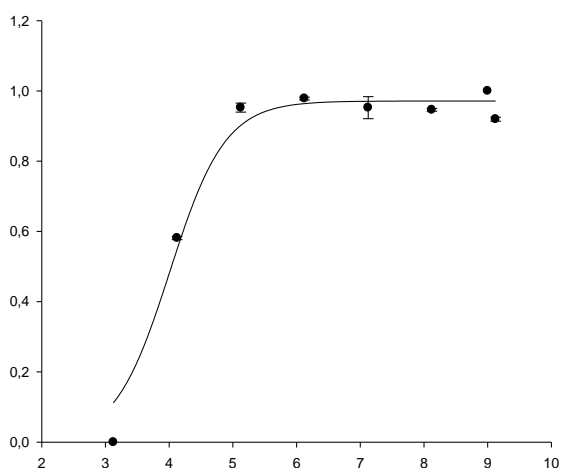
<b>FF33</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0, 673 nM	6,683 nM	66,83 nM	668,3 nM	6,683 µM	66,83 µM	668,3 µM
V 1 parallell	5656.2	5318.3	5369.6	5445.7	4112.7	729.55	0	0
V 2 parallell	5826.4	5243.6	5639.8	5663.4	4311.2	1389.0	0	0
V 3 parallell	5672.2	4906.4	4693.1	5259.9	3901.8	412.9	0	0
V 4 parallell	5961.1	5312.7	5393.4	5687.3	4198.4	1114.4	0	0
Vi/Vo 1	1.0000	0.94026	0.94933	0.96278	0.72711	0.12898	0	0
Vi/Vo 2	1.0000	0.89997	0.96797	0.97202	0.73994	0.23840	0	0
Vi/Vo 3	1.0000	0.86499	0.82739	0.92731	0.68788	0.07279	0	0
Vi/Vo 4	1.0000	0.89123	0.90477	0.95407	0.70430	0.18695	0	0
Vi/Vo gjennom.	1.0000	0.89911	0.91237	0.95405	0.71481	0.15678	0	0
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.03120	0.06255	0.01927	0.02323	0.07165	0	0

<b>SM434</b>	Vo	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi	Vi
Hemmer kons. I brønn på plate	Buffer 2	0, 475 nM	4,752 nM	47,52 nM	475,2 nM	4,752 µM	47,52µM	475,2 µM
V 1 parallell	8072.9	7767.6	5578.4	7070.9	7633.4	7375.0	6488.0	2974.7
V 2 parallell	8609.1	8531.1	7623.1	7872.3	7834.7	7866.8	6764.2	2912.4
Vi/Vo 1	1.0000	0.96218	0.69100	0.87588	0.94556	0.91355	0.80368	0.36848
Vi/Vo 2	1.0000	0.99094	0.88547	0.91442	0.91005	0.91378	0.78570	0.33829
Vi/Vo gjennoms.	1.0000	0.97656	0.78824	0.89515	0.92781	0.91367	0.79469	0.35339
Vi/Vo st. avvik	1.0000	0.02037	0.13751	0.02725	0.02511	0.00016	0.01271	0.02135

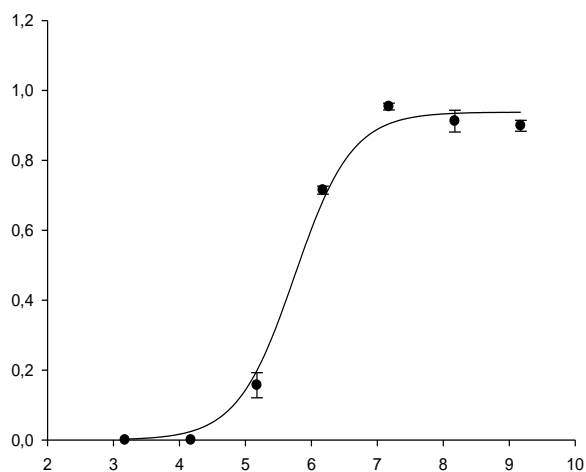
**D. Dose-respons kurver for utvalgte forbindelser mot TLN ved bruk av AGLA som ikke inngikk i oppgaven.**

Felles for alle graffer er at X-akse representerer  $\log [I]$  ( $\mu\text{M}$ ), og Y-akse er  $V_i/V_0$ .

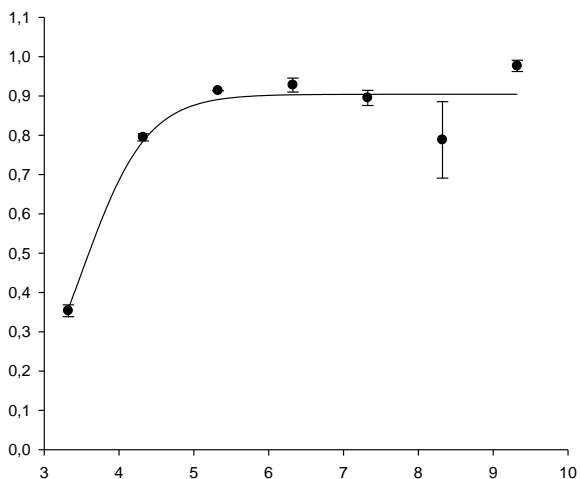
Konsentrasjoner for hemmerer i disse tilfellene 10 gang større enn med eksperimentene med TLN + BLS.



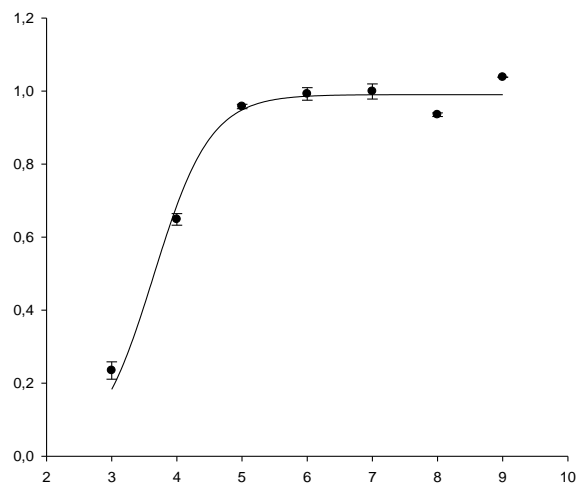
**BF 66**



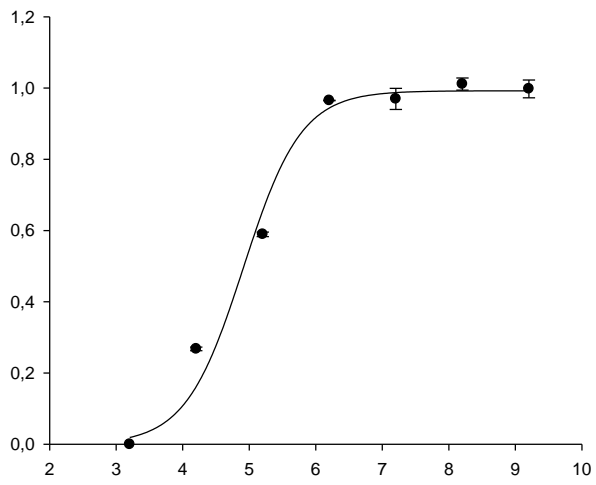
**FF33**



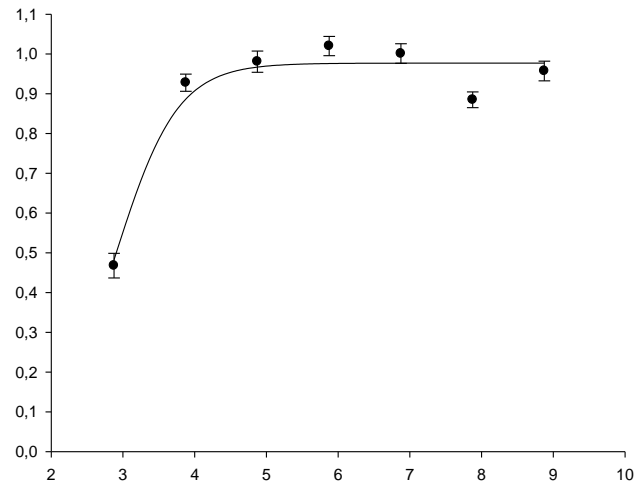
**SM 434**



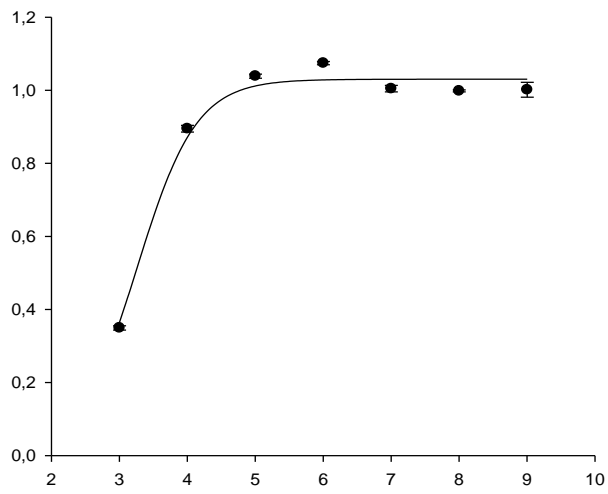
**BF 268**



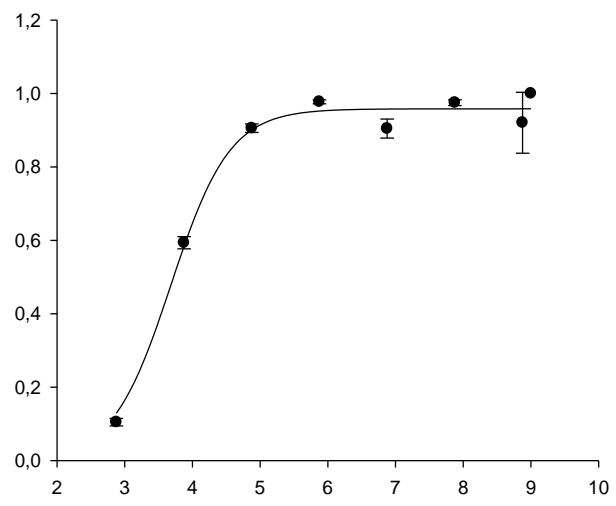
**BF 282**



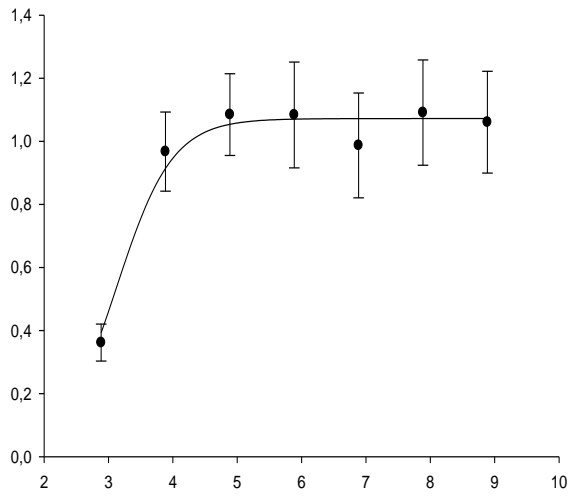
**BF 407**



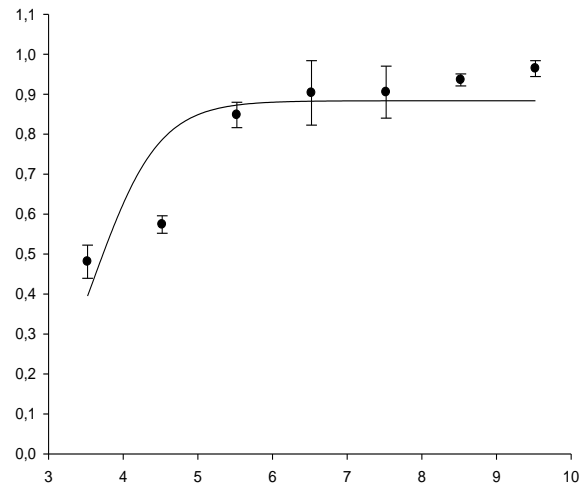
**BF 418**



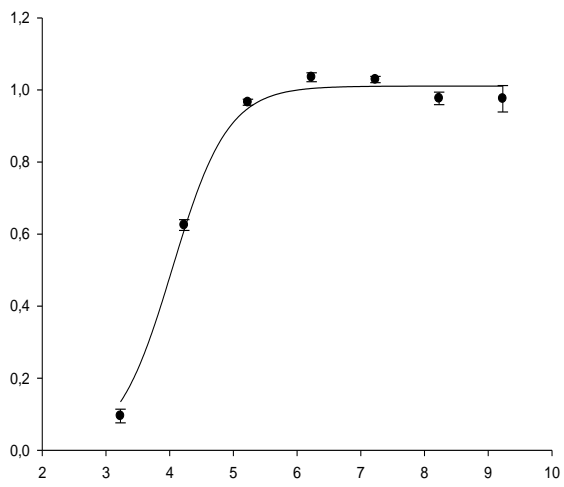
**BF 429**



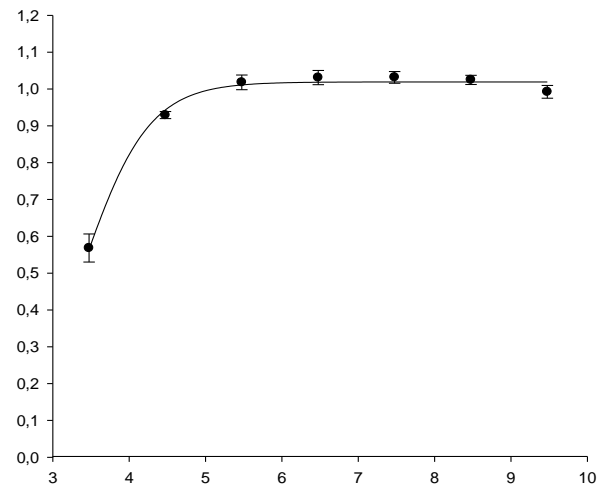
**BF 421**



**EN 204**

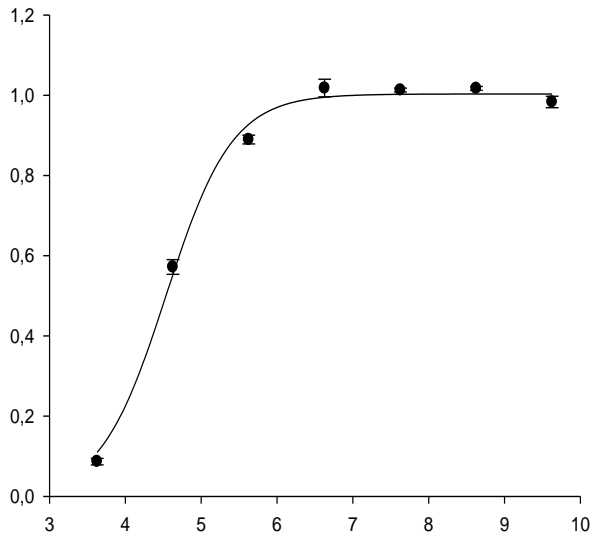


**FC 107**

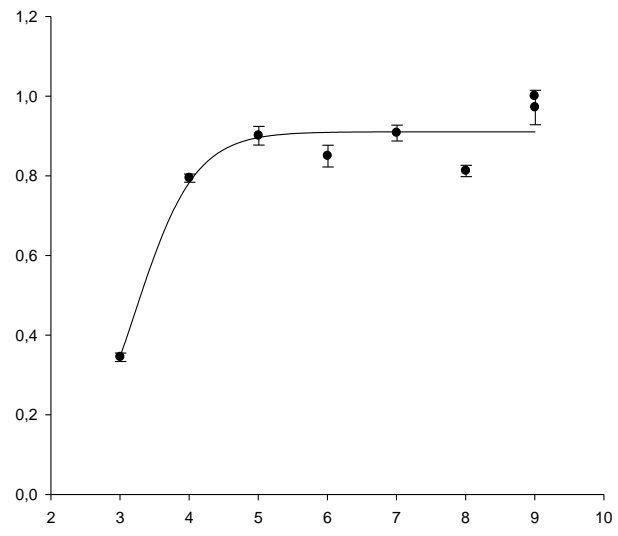


**EN 73**

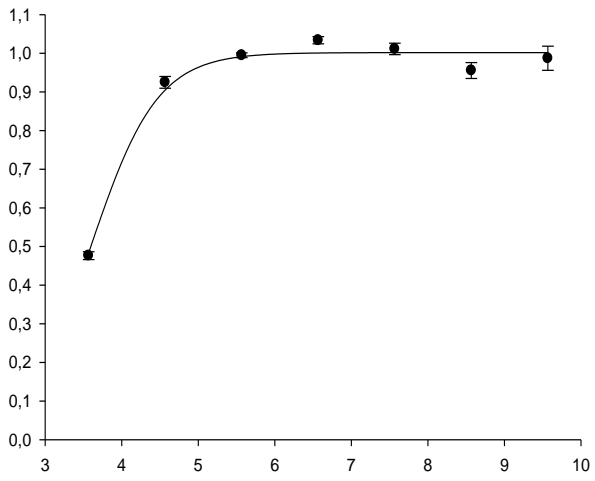




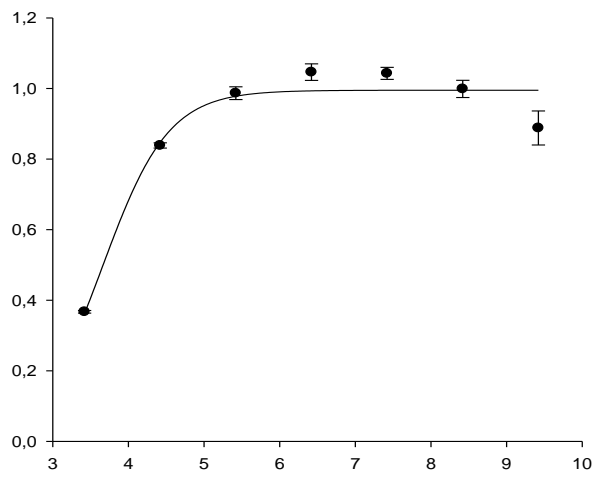
**ML 25**



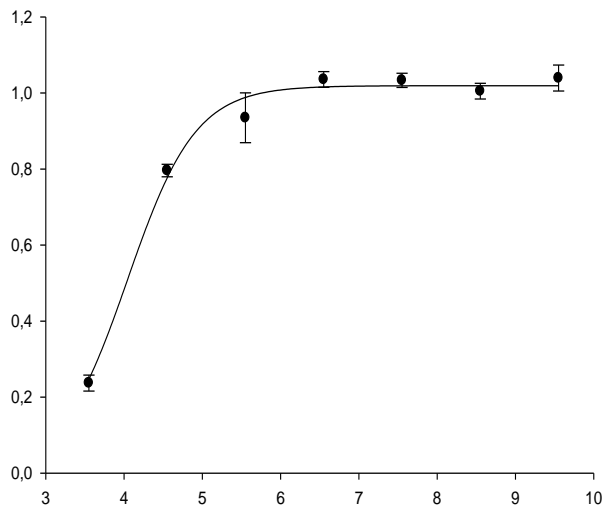
**PP 173**



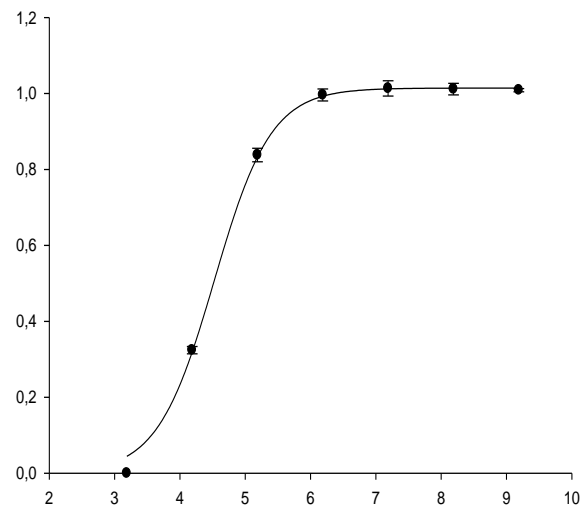
**SM 26**



**SM 27**

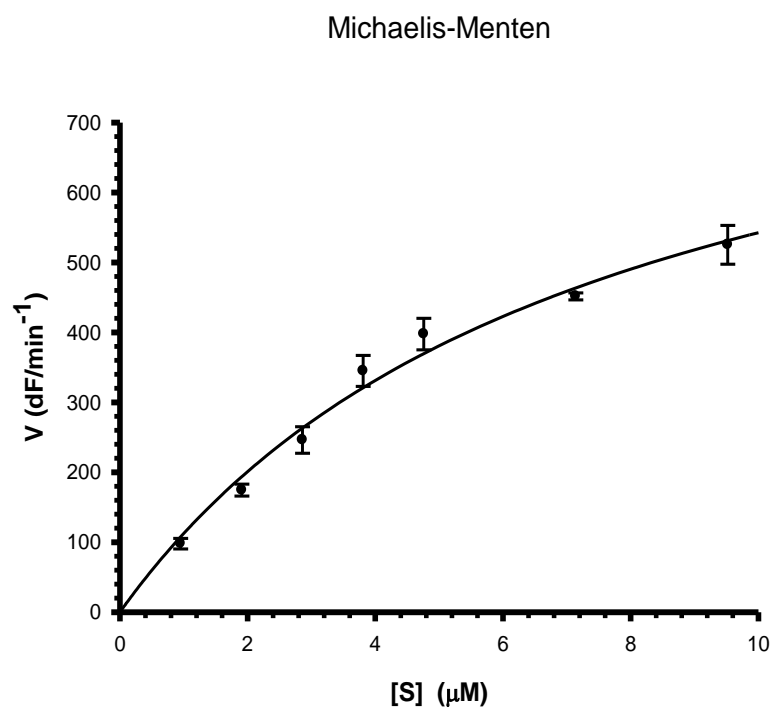


**CC 30**



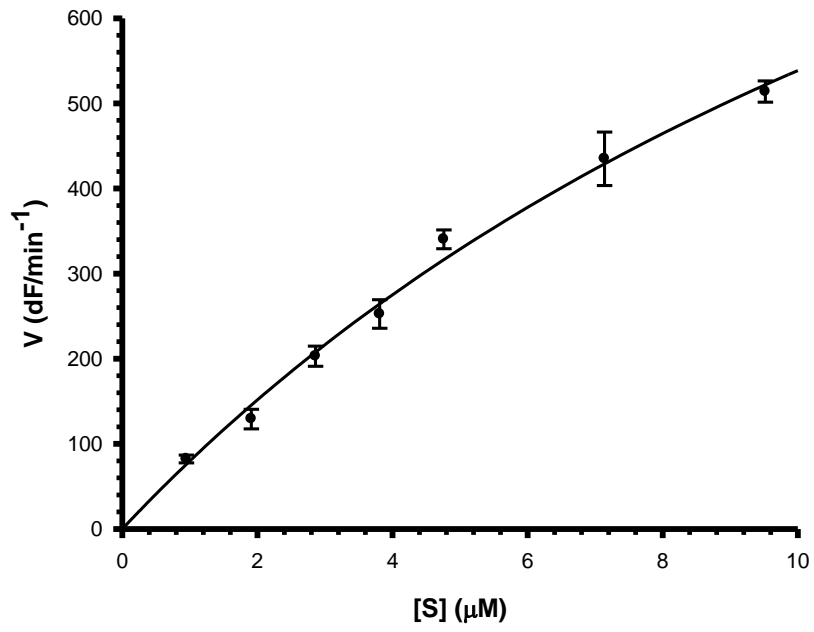
**F 09**

**E.** Tre andre Michaelis-Menten kurver som inngikk ikke i oppgaven.



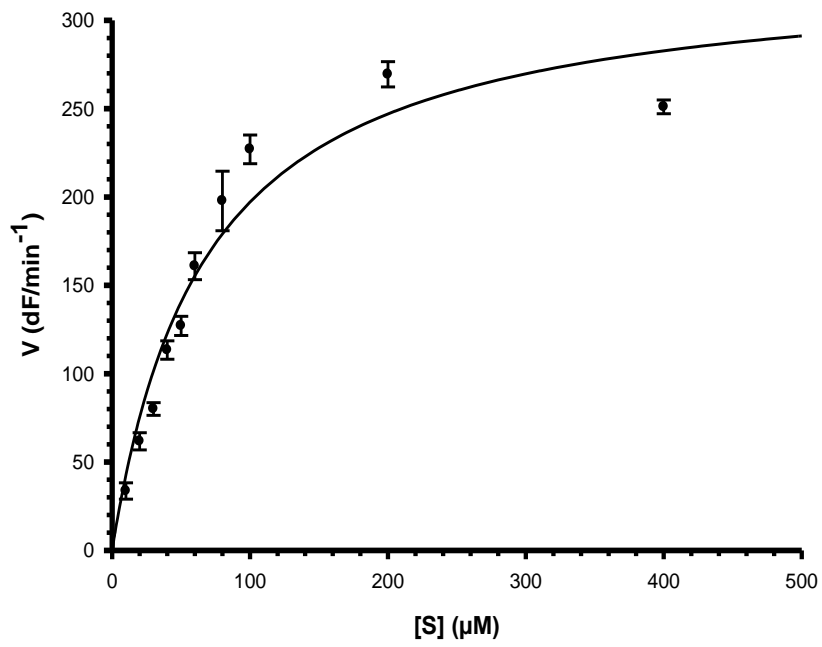
Km\_PsE\_BLS

Michaelis-Menten



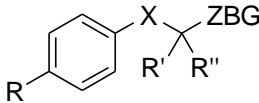
Km\_TLN\_Brad

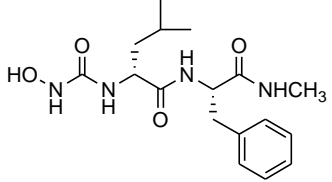
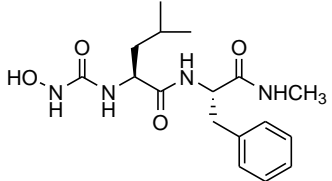
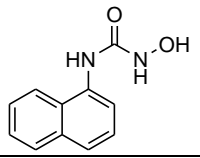
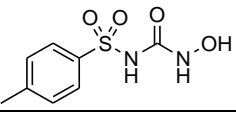
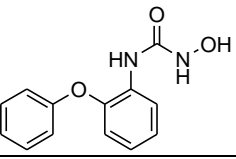
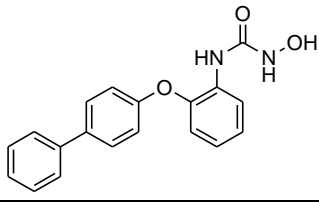
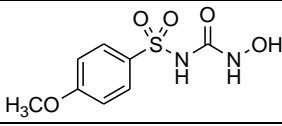
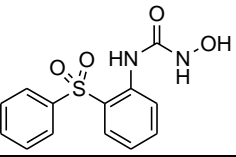
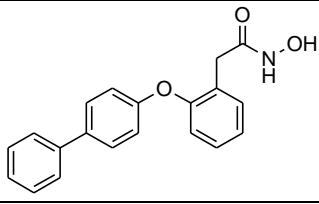
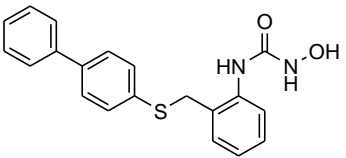
Michaelis-Menten

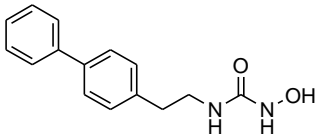


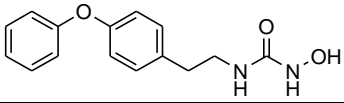
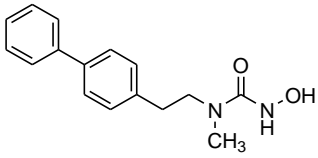
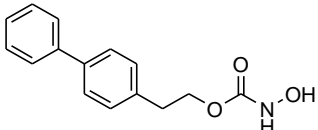
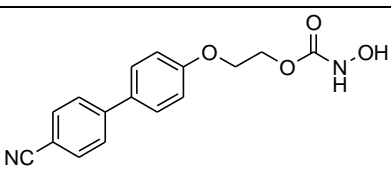
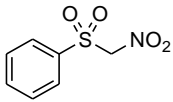
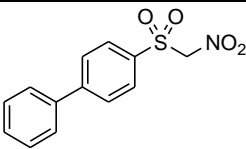
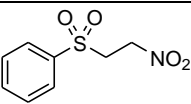
Km\_TLN\_AGLA

**F. Tabeller med forbindelser fra samarbeidspartnere i Italia.**

						
Compound	R	R'	R''	X	ZBG	MW
1 ELE5	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	312.28
2 FF34	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	COOH	276.31
3 FF33	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	CONHOH	275.33
4 MT260	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	S	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	280.28
5 MT113c	(4-CH <sub>3</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> , cyclohexylamine salt	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	441.49
6 MT137	(4-Cl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73
7 MT155	(4-CF <sub>3</sub> )-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	326.31
8 VM19	(3-Cl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	346.73
9 VDL22	2-thienyl	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	318.31
10 MT152	(4-CH <sub>3</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	358.31
11 MT200	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )C≡C	H	H	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	336.31
12 VDL29	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	326.31
13 VDL28	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	H	SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	340.34
14 MT176	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	368.39
15 MT35	(4-CH <sub>3</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	H	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	432.44
16 MT179	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	SO <sub>2</sub>	PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	340.34

Compound		MW	Weight of the sample
17 PP170		350.41	5.0 mg
18 PP173		350.41	5.0 mg
19 BF144		202.21	5.0 mg
20 BF243		230.24	5.0 mg
21 BF249		244.25	5.0 mg
22 BF252		320.34	5.0 mg
23 BF255		246.24	5.0 mg
24 BF268		292.31	5.0 mg
25 BF282		319.35	5.0 mg
26 BF298		350.44	5.0 mg

27 BF17		256.30	5.0 mg
------------	---	--------	--------

28 BF58		272.30	5.0 mg
29 BF16		270.33	5.0 mg
30 BF20		257.29	5.0 mg
31 BF66		298.29	5.0 mg
32 BF407		201.20	5.0 mg
33 BF418		277.30	5.0 mg
34 BF421		215.23	5.0 mg

35 SM335	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> cyclohexylamine salt	496.60	5.0 mg
36 SM321	(4- <i>i</i> PrO)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	526.63	5.0 mg
37 SM233	(4-Cl)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	502.99	5.0 mg
38 SM323	(4-F)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	486.54	5.0 mg
39 SM328	(4-Me)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	482.57	5.0 mg
40 SM319	(4-EtO)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	512.60	5.0 mg
41 SM433	(3-Me)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	482.57	5.0 mg
42 SM434	Br cyclohexylamine salt	471.35	5.0 mg
43 SM153	(4-MeO)-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> cyclohexylamine salt	498.57	5.0 mg





