Molekulsko modeliranje inhibicije acetilkolinesteraze

Šokčević, Anamaria

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:715067

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anamaria Šokčević

MOLEKULSKO MODELIRANJE INHIBICIJE ACETILKOLINESTERAZE

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Anamaria Šokčević

MOLEKULSKO MODELIRANJE INHIBICIJE ACETILKOLINESTERAZE

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Rad je ostvaren u: Medicinskom fakultetu Osijek

Mentor rada: Doc. dr. sc. Hrvoje Brkić

Rad ima 40 listova, 12 tablica i 14 slika.

ZAHVALA

Veliko hvala mentoru doc. dr. sc. Hrvoju Brkiću na razumijevanju, strpljenju, brojnim savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Također zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima što su mi uljepšali i olakšali dane studiranja, sve je lakše uz vas. Veliko hvala Martini na pruženom prijateljstvu, podršci i svim riječima ohrabrenja.

Hvala dečku na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci.

Posebna zahvala mojoj obitelji. Mama, tata i seko hvala na svoj ljubavi i što ste uvijek vjerovali u mene. Bez vas ništa ne bi imalo smisla.

Sadržaj

1.UVOD 1

1.1. Enzimi 1

1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija 2

1.1.2. Inhibicija enzima 2

1.2. Acetilkolinesteraza 3

1.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja AChE 3

1.2.2. Inhibitori AChE 5

1.3. Uloga inhibicije AChE u liječenju Alzheimerove bolesti 6

1.4. β-kariofilen 7

1.5. Računalne metode 8

2. CILJ 9

3. MATERIJALI I METODE 10

3.1. Ustroj studije 10

3.2. Materijali 10

3.3. Metode 10

3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora 10

3.3.2. Metoda uklapanja 11

3.3.3. MD simulacije 12

3.3.4. Vizualizacija molekula 13

3.4. Statističke metode 13

4. REZULTATI 14

4.1. Rezultati dobiveni korištenjem PatchDock servera 14

4.2. Rezultati dobiveni korištenjem Haddock servera 22

4.3. Rezultati MD simulacije 29

5. RASPRAVA 31

6. ZAKLJUČAK 33

7. SAŽETAK 34
8. SUMMARY 35
9. LITERATURA 36
10. ŽIVOTOPIS 40

POPIS KRATICA

Å – angstrem (10^{-10} m), mjerna jedinica za duljinu

ACh – acetilkolin (*engl. Acetylcholine*)

AChE – acetilkolinesteraza (*engl. Acetylcholinesterase*)

AChE-E – eritrocitna AChE (*engl. Erythrocytic AChE*)

AChE-R – izoforma AChE (*engl. "readthrough"*)

AChE-S – sinaptička AChE (*engl. Synaptic AChE*)

AD – Alzheimerova bolest (*engl. Alzheimer's disease*)

Ala – aminokiselina alanin (također oznaka A)

Arg – aminokiselina arginin (također oznaka R)

Asn – aminokiselina asparagin (također oznaka N)

BChE – butirilkolinesteraza (*engl. Butyrylcholinesterase*)

CB2 – kanabinoidni receptor 2 (*engl. cannabinoid receptor 2*)

ChE – kolinesteraza (*engl. Cholinesterase*)

Cys – aminokiselina cistein (također oznaka C)

Gln – aminokiselina glutamin (također oznaka Q)

Glu – proteinogena aminokiselina glutaminska kiselina (također oznaka E)

Gly – aminokiselina glicin (također oznaka G)

GPI – glikofosfatidilinozitol (*engl. Glycosylphosphatidylinositol*)

His – aminokiselina histidin (također oznaka H)

IUB – Međunarodna unija za biokemiju (*engl. International Union of Biochemistry*)

Leu – aminokiselina leucin (također oznaka L)

MD – molekulska dinamika (*engl. Molecular dynamics*)

PDB – proteinska baza podataka (*engl. Protein Data Bank*)

Phe – aminokiselina fenilalanin (također oznaka F)

PRiMA – membransko proteinsko sidro bogato prolinom (*engl. Proline-rich membrane anchor protein*)

Pro – aminokiselina prolin (također oznaka P)

RNA – ribonukleinska kiselina (*engl. Ribonucleic acid*)

Ser – aminokiselina serin (također oznaka S)

Trp – aminokiselina triptofan (također oznaka W)

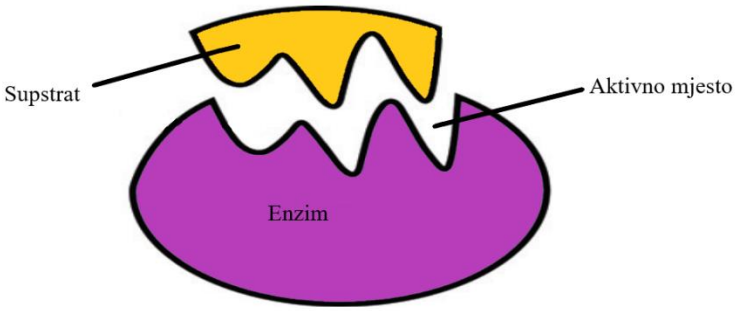
Tyr – aminokiselina tirozin (također oznaka Y)

VMD – računalni program za vizualiziranje molekula (*engl.Visual Molecular Dynamics*)

1.UVOD

1.1. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori čija aktivnost ima važnu ulogu u izvršavanju metaboličkih reakcija. S iznimkom katalitičkih molekula ribonukleinske kiseline (*engl. Ribonucleic acid,* RNA) ili ribozima, po kemijskoj strukturi enzimi su proteini te posjeduju sve njihove karakteristike (1, 2). Posjeduju zavidnu katalitičku aktivnost, specifičnost prema supstratu i stereospecifičnost što im omogućuje obavljanje ključne uloge u procesima bitnima za ljudsko zdravlje. Zbog velikog katalitičkog učinka enzimi su potrebni u niskim koncentracijama te se sudjelovanjem u reakcijama ne troše niti se trajno mijenjaju (3). Osim što su vrlo snažni katalizatori, enzimi također imaju izuzetnu specifičnost za vrstu reakcije koju kataliziraju i za supstrat ili skupinu srodnih supstrata (2, 3). Enzimi su globularni proteini čija veličina varira od manje od 100 do više od 2000 aminokiselinskih ostataka. Aminokiseline su raspoređene kao jedan ili više polipeptidnih lanaca koji savijeni tvore specifičnu trodimenzionalnu strukturu, uključujući područje poznato kao aktivno mjesto (Slika 1.), gdje se supstrat zapravo veže (3). Odbor za enzime Međunarodne unije za biokemiju *(engl. International Union of Biochemistry*, IUB) 1964. godine uspostavlja jednoznačan sustav nomenklature i klasifikacije enzima prema kojemu svaki enzim ima jedinstveni naziv i klasifikacijski broj (1 – 3). Rod kojemu enzim pripada definiran je prvom znamenkom (1. oksidoreduktaze, 2. transferaze, 3. hidrolaze, 4. liaze, 5. izomeraze, 6. ligaze), dok druga i treća znamenka označavaju razred i podrazred enzima, a četvrta znamenka je individualni broj enzima u podrazredu (1).



Slika 1. Prikaz vezivanja supstrata za aktivno mjesto enzima. Sliku izradila autorica.

1.1.1. Kinetika enzimskih reakcija

Brzina enzimske reakcije određena je okolinom i uvjetima prilikom kojih se odvija, a razni čimbenici mogu utjecati na brzinu enzimski kataliziranih reakcija putem reverzibilnih ili nepovratnih promjena u strukturi proteina. Čimbenici koji utječu na brzinu su: pH, temperatura, koncentracija supstrata, koncentracija i ionska jakost pufera te prisutnost aktivatora, inhibitora i raznih koenzima (1, 3, 4). Porastom temperature povećava se brzina enzimske reakcije do određene granice, no zbog kemijske strukture enzima porast temperature dovodi do denaturacije i ireverzibilne inhibicije enzima (3). Za svaki enzim postoji optimalni pH pri kojem je brzina enzimske reakcije najveća. Porastom koncentracije supstrata povećava se brzina reakcije dok se ne dosegne maksimalna vrijednost (4, 5). Michaelis-Mentenova jednadžba prikazuje odnos između koncentracije supstrata [S] i početne brzine reakcije v_0. Michaelisova konstanta (K_m) je koncentracija supstrata za koju početna brzina iznosi polovicu maksimalne brzine ($V_{max}/2$).

$$v_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

1.1.2. Inhibicija enzima

Tvari koje usporavaju ili zaustavljaju enzimski kataliziranu reakciju nazivaju se inhibitori. Inhibicija može biti reverzibilna i ireverzibilna. Djelovanjem na kinetiku reakcije između enzima i supstrata dolazi do reverzibilne inhibicije, a potpuna inhibicija obično se postiže izuzetno brzo jer ne dolazi do kemijske reakcije (3, 4, 6). *In vivo*, brzina oporavka od učinaka reverzibilnog inhibitora ovisit će o brzini njegovog uklanjanja iz tkiva metabolizmom i eliminacijom (6). Reverzibilna inhibicija može biti kompetitivna, kada se inhibitor, kao i supstrat, veže na aktivno mjesto enzima, nekompetitivna, kada se veže na neko drugo mjesto na enzimu i akompetitivna, kada se inhibitor veže za već stvoreni kompleks enzim-supstrat (4). Ireverzibilna inhibicija uključuje trajne kemijske modifikacije kao što su stvaranje ili kidanje kovalentnih veza s aminokiselinskim ostacima koji su nužni za vezanje supstrata, katalizu ili održavanje konformacije enzima (4). Ove kovalentne promjene relativno su stabilne te enzim koji je inhibiran ireverzibilnim inhibitorom ostaje inhibiran čak i nakon uklanjanja inhibitora iz okolnog medija. Mnogi su ireverzibilni inhibitori, kao npr. teški metali ili neko acilirajuće sredstvo, stoga snažni toksini (3, 4, 6). Inhibicija povratnom

spregom je kontrolni mehanizam enzimske aktivnosti koji označava inhibiciju prvog enzima u nizu reakcija određenog biosintetskog puta pomoću konačnog produkta biosinteze (7).

1.2. Acetilkolinesteraza

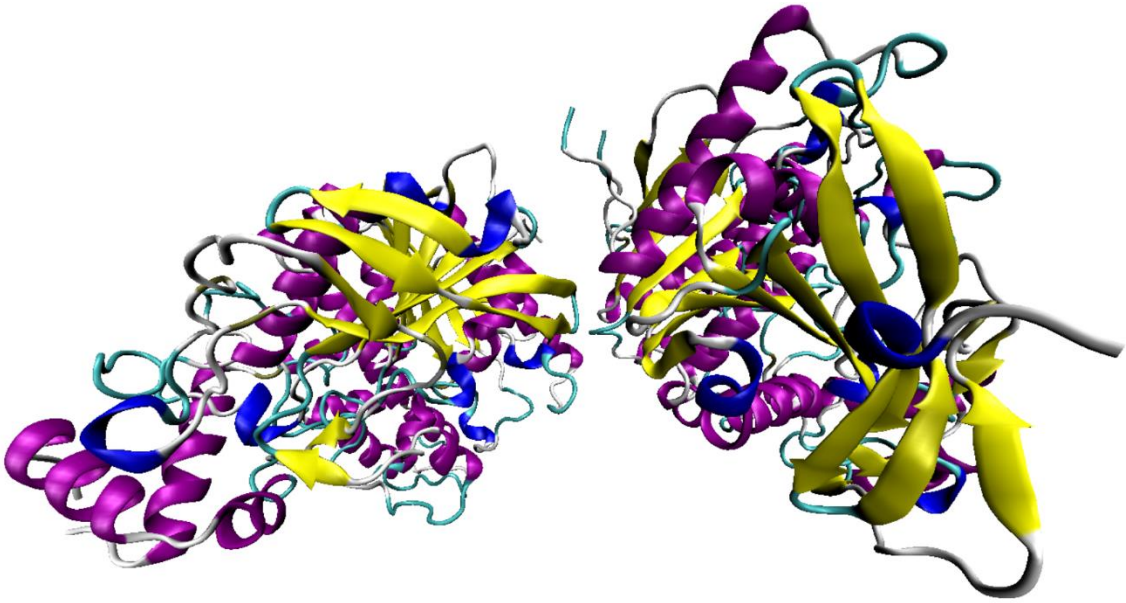
Kolinesteraze (*engl. Cholinesterase,* ChE) su serinske hidrolaze koje preferencijalno djeluju na estere kolina (8). U ljudskom organizmu razlikuju se dva enzima koji kataliziraju hidrolizu acetilkolina (*engl. Acetylcholine,* ACh), acetilkolinesteraza (*engl. Acetylcholinesterase,* AChE; EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (*engl. Butyrylcholinesterase,* BChE; EC 3.1.1.8), koji su intenzivno proučavani unutar područja biomedicine i toksikologije zbog svoje važne zadaće u organizmu (6, 8, 9).

Enzim AChE je specifična esteraza koja pripada rodu hidrolaza, razredu serinskih esteraza i podrazredu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. AChE ima sistemsko ime acetilkolin-acetilhidrolaza, također je poznata kao prava kolinesteraza, kolinesteraza I, kolinesteraza, acetiltiokolinesteraza, acetilkolin hidrolaza, acetil.beta-metilkolinesteraza, AcCholE (10). Glavna fiziološka funkcija enzima AChE je prekidanje prijenosa impulsa brzom hidrolizom neurotransmitera ACh-a u brojnim kolinergičkim putovima u središnjem i perifernom živčanom sustavu (11, 12). AChE hidrolizira ACh na acetat i kolin tijekom transmisije živčanih podražaja što osigurava u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama normalan prijenos signala (11, 13). Konstanta brzine hidrolize ACh, k_{cat}, iznosi oko 400 000 min^{-1}, stoga enzim AChE opisujemo kao jedan od najdjelotvornijih enzima u prirodi prema brzini hidrolize ACh-a jer je njegova hidroliza uvjetovana samo brzinom prijenosa supstrata u aktivno mjesto enzima (9). AChE se nalazi u visokim koncentracijama uglavnom u crvenim krvnim zrncima, kao i u mozgu na neuromišićnim spojevima i kolinergičkim sinapsama mozga (14, 15).

1.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja AChE

Humana AChE sadržava oko 550 aminokiselina (≈ 66 kDa), a molekula AChE sastoji se od dvije različite proteinske domene: velika katalitička domena od oko 500 ostataka i mali C-terminalni peptid s manje od 50 ostataka (10, 11). AChE, koja nastaje kao proizvod gena s kromosomske pozicije 7q22, eksprimira se u tri izoforme enzima u različitim tkivima te svaka izoforma ima različitu duljinu C-terminalnog kraja (8, 9). Sinaptička AChE *(engl.*

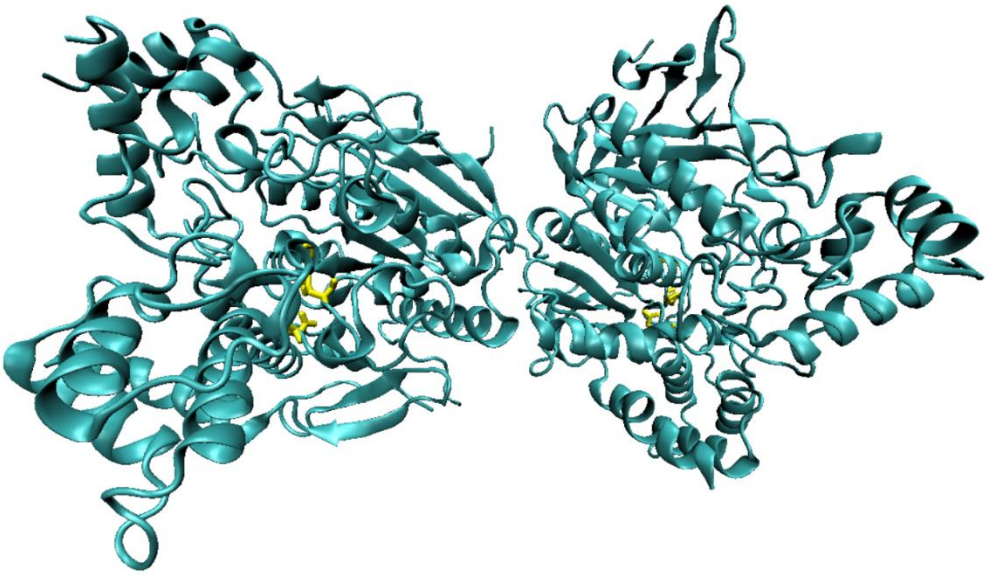
Synaptic AChE, AChE-S) predstavlja glavni multimerni enzim u mozgu i mišićima i prisutna je u obliku tetramera. Tetramerne podjedinice organizirane su oko membranskog proteinskog sidra bogatog prolinom (*engl. Proline-rich membrane anchor protein*, PRiMA) koje je smješteno na kraju kolagenskog vlakna (8, 9, 14). AChE-S izoforma nosi glavnu ulogu u hidrolizi neurotransmitera ACh-a u sinapsi. AChE-R (*engl. "readthrough"*) javlja se u obliku topljivog monomera, inducirana je kemijskim i fizičkim stresom, a smještena je u sinaptičkoj pukotini ili u krvi (11). Eritrocitna AChE (*engl. Erythrocytic AChE,* AChE-E) je dimer povezan glikofosfatidilinozitolnim (*engl. Glycosylphosphatidylinositol,* GPI) sidrom na membranu eritrocita i limfocita (11). U osnovnoj strukturi AChE sadrži 12 β-nabranih ploča koje okružuje 14 α-uzvojnica (Slika 2.), zbog čega je svrstana u skupinu hidrolaza α/β-strukture (12).



Slika 2. Struktura enzima AChE. 12 β-nabranih ploča (prikazano žutom bojom) okruženih s 14 α-uzvojnica (prikazano ljubičastom bojom). Sliku izradila autorica.

Aktivno mjesto enzima AChE je ždrijelo dužine 20 angstrema (Å) i širine oko 5 Å, a uključuje četiri domene: katalitičko mjesto, kolinsko mjesto, acilni džep i periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela (9, 12, 16). Katalitičko mjesto čini katalitička trijada koja se nalazi na dnu oksianionske šupljine, a sadrži aminokiseline Ser203, His447 i Glu334 (Slika 3.) (9). Kolinsko mjesto bitno je jer stabilizira pozitivno nabijeni kvaterni dio kolinskih supstrata, dok

je acilni džep zadužen za smještanje acilnog dijela supstrata (16). Hidroliza supstrata događa se u tri koraka. Prvi korak je stvaranje Michaelisova kompleksa, zatim dolazi do aciliranja enzima te naposljetku njegovog deaciliranja vodom (9).



Slika 3. Aktivno mjesto AChE; žutom bojom označena katalitička trijada: Ser203, His447 i Glu334. Sliku izradila autorica.

1.2.2. Inhibitori AChE

Inhibicijom aktivnosti enzima AChE povećava se razina i trajanje djelovanja neurotransmitera, dolazi do nagomilavanja ACh-a i disbalansa u prijenosu živčanih signala što se očituje tzv. kolinergičkom krizom (12). Javljaju se pojačana salivacija, mučnine i paraliza dišnog sustava, a kao krajnji ishod ove krize javlja se smrt organizma (9). Prema načinu djelovanja, AChE inhibitori mogu se podijeliti u dvije skupine: ireverzibilni i reverzibilni. Enzim AChE inhibiran je viškom supstrata. Reverzibilni inhibitori, kompetitivni ili nekompetitivni, uglavnom imaju terapeutsku primjenu, dok su toksični učinci povezani s ireverzibilnim modulatorima aktivnosti ovog enzima (17).

Reverzibilni inhibitori enzima AChE imaju važnu ulogu u farmakološkoj manipulaciji enzimskom aktivnosti, a njihova interakcija s AChE nekovalentne je prirode. Ovi inhibitori uključuju spojeve s različitim funkcionalnim skupinama (karbamatna, kvartarna ili tercijarna amonijeva skupina), a primijenjeni su u dijagnostici i/ili liječenju različitih bolesti kao što su: Alzheimerova i Parkinsonova bolest, postoperativni ileus, miastenija gravis,

glaukom te kao protuotrov za predoziranje antikolinergicima (12, 13). Većina reverzibilnih inhibitora nalazi se u prirodi i uglavnom su izolirani iz biljaka, kao npr. alkaloidi (solanin, huperzin A, solanidin) i flavonoidi (npr. galangin) (17, 18). Nove spoznaje o samom enzimu AChE te uključenost u patologiju mnogih bolesti potaknule su sintetiziranje novih inhibitora pa se danas u kliničkoj upotrebi koriste različiti reverzibilni inhibitori ovog enzima kao što su donepezil i takrin primjenjeni u terapiji demencije (9, 19). Reverzibilni inhibitori obično se vežu ili u aktivno mjesto ili na periferno mjesto enzima, a mogu se vezati i istodobno na oba mjesta (20).

Ireverzibilni inhibitori s katalitičkim serinom u aktivnome mjestu enzima AChE stvaraju Michaelisov tip kompleksa (9). Organofosforni i karbamatni pesticidi poznati su kao specifični inhibitori katalitičke aktivnosti AChE. Spojevi organofosfora i karbamata vežu se s promjenjivim afinitetom na esteratsko mjesto fosforilacijom, odnosno dekarbamiliranjem i inaktiviraju enzim (11). Karbamat fizostigmin (eserin), prvi poznati inhibitor ove skupine enzima, koristi se u terapiji miastenije gravis i demencije, a isto tako uspješno je korišten i u liječenju glaukoma (12). Brojni sintetički karbamati, kao što su rivastigmin i bambuterol, imaju primjenu kao lijekovi, no sinteza karbamatnih inhibitora razvija se u svrhu korištenja ovih inhibitora kao pesticida (9). Karbamatni pesticidi u upotrebi su: aldikarb, karbaril, karbofuran, metiokarb i metomil. Organofosfatni i karbamatni pesticidi naširoko se koriste za suzbijanje štetočina na usjevima u poljoprivredi i stoci te za stambenu uporabu, uključujući suzbijanje insekata u kućanskim i vrtnim namjenama (11). Od organofosfornih pesticida koriste se metamidofos, fenamifos, diklorovos, klorpirifos, malation i diazinon (9). Poznata je primjena organofosfornih spojeva (soman, tabun, sarin) kao bojnih otrova koji su neurotoksični.

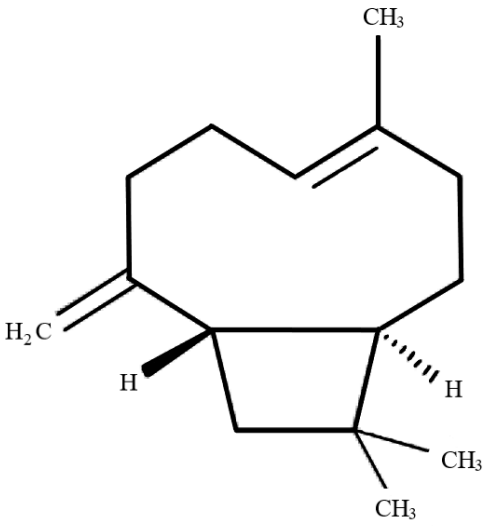
1.3. Uloga inhibicije AChE u liječenju Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest *(engl. Alzheimer's disease*, AD) je najčešća vrsta demencije zastupljena u modernom društvu, a očituje se progresivnim propadanjem kognitivnih funkcija, dezorijentacijom i nesvjesnim ponašanjem u društvu, postupnim gubitkom pamćenja i sve većim kognitivnim smetnjama (18, 20). AD je veliki javnozdravstveni problem, posebno zbog sve većeg starijeg stanovništva u razvijenim zemljama (21). Patofiziološki procesi opisani za progresiju AD-a uključuju degeneraciju neurona i sinapsi koja je posljedica depozita β–amiloida, pojave senilnih plakova i stvaranja neurofibrilarnih tračaka u kori mozga, kao i neuroinflamaciju, oštećenja mitohondrija, oksidativni stres i ekscitotoksičnost, koji ometaju

nekoliko signalnih puteva neurotransmitera (18). Enzimi koji sudjeluju u sintezi i razgradnji ACh-a sniženi su kod pacijenata oboljelih od AD-a u odnosu na aktivnost tih enzima kod zdrave osobe. Neke od teorija koje ukazuju na primarni uzrok bolesti su: hipoteza amiloidne kaskade, oksidacijski stres, τ-hipoteza, kolinergična (propadanje kolinergičnih neurona i smanjenje sinteze ACh-a) i dr. Pristup koji se pokazao najviše uspješnim pri ublažavanju simptoma proizašao je iz kolinergične hipoteze, a uključuje korištenje inhibitora enzima AChE (15, 17). Lijekovi kao što su takrin, galantamin, donepezil i rivastigmin su inhibitori AChE enzima te uglavnom povećavaju količinu ACh-a blokiranjem njegove hidrolize (17, 20, 21). AChE ima iznimnu važnost za očuvanje homeostaze organizma te se zbog svoje funkcije u neurološkom sustavu aktivno i kontinuirano istražuje unutar područja toksikologije i biomedicine. AChE je važna meta u tretmanima raznih neurodegenerativnih bolesti kao npr. AD, Parkinsonova bolest i druge. Inhibitori enzima AChE imaju važnu funkciju u liječenju pacijenata s AD-om.

1.4. β-kariofilen

Beta (β)-kariofilen je prirodni biciklički seskviterpen. Uglavnom se nalazi u smjesi s α-kariofilenom (α-humulen) koji je izomer s otvorenim prstenom i izokariofilenom (cis izomerom dvostruke veze) (22). Za β-kariofilen karakterističan je ciklobutanski prsten i trans-dvostruka veza u deveteročlanom prstenu (Slika 4.), što se rijetko susreće u prirodi (23).



Slika 4: Ciklobutanski prsten β-kariofilena s trans-dvostrukom vezom. Sliku izradila autorica.

Sastojak je raznih esencijalnih ulja, posebice onih napravljenih od stabljika i cvijeća klinčića (*lat. Syzygium aromaticum*), ružmarina (*lat. Rosmarinus oficinalis*), eteričnog ulja od konoplje (*lat. Cannabis sativa*) i hmelja (24). Njegovi biološki učinci uključuju antioksidativno, protuupalno, antikancerogeno, kardioprotektivno, hepatoprotektivno, gastroprotektivno, nefroprotektivno, antimikrobno i imunomodulacijsko djelovanje. Nedavna istraživanja upućuju da ima i neuroprotektivni učinak (25). Beta (β)-kariofilen ima zaštitnu ulogu kod brojnih poremećaja povezanih sa živčanim sustavom, uključujući bol, tjeskobu, grč, konvulzije, depresiju, alkoholizam i AD. Osim toga, β-kariofilen pokazuje lokalnu anestetičku aktivnost, koja bi mogla zaštititi živčani sustav od oksidativnog stresa i upale te može djelovati kao imunomodulatorno sredstvo. Većina neuroloških aktivnosti povezana je s činjenicom da je β-kariofilen ligand kanabinoidnog receptora 2 (*engl. cannabinoid receptor 2*, CB2). Aktivacija CB2 smanjit će bol, glavni signal upalnih odgovora (26). Trenutno dostupni podaci ukazuju na to da β-kariofilen ima učinak na živčani sustav i može biti koristan za razvoj neuroaktivnih sredstava za liječenje i prevenciju neuroloških bolesti i poremećaja.

1.5. Računalne metode

Računalne metode počele su se primjenjivati sredinom prošlog stoljeća, a svoj razvoj zahvaljuju razvoju računalne tehnologije. Različite računalne metode koriste se golemim računalnim sposobnostima te se njihova dostupnost i mogućnosti povećavaju povećavanjem računalnih resursa kao što su brzina procesora, grafičkih procesorskih jedinica, spremišni prostor i dr. Jedna od važnijih primjena računalnih metoda je u bioinformatici koja se koristi golemim računalnim sposobnostima skladištenja i obrade informacija, radi prikupljanja, uspoređivanja i analiziranja bioloških podataka na globalnoj razini i s globalnim učinkom. Također je važna primjena računalnih metoda u računalnoj biologiji čiji je primarni cilj razvijanje računalnih modela na kojima se primjenjuju različita fizikalna, kemijska i biološka načela u svrhu istraživanja ponašanja bioloških molekula i procesa. Osmišljavanje tj. otkrivanje lijekova pomoću računalnih metoda ubrzano je nastojanjem da se potencijalni inhibitori povežu s odabranim ciljnim proteinima *in silico*.

2. CILJ

Ciljevi istraživanja su metodama molekulskog modeliranja ispitati inhibiciju acetilkolinesteraze, ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu i metodama molekulske dinamike pronaći aminokiselinske ostatke koji sudjeluju u vezanju inhibitora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija – izgradnja računalnog modela enzima i inhibitora (27, 28). *In silico* proučavanja u medicini imaju potencijal ubrzati pronalazak znanstvenih dostignuća, a smanjiti trenutnu potrebu za skupim laboratorijskim istraživanjima i kliničkim ispitivanjima.

3.2. Materijali

Podaci o enzimu AChE preuzeti su iz Proteinske baze podataka (*engl. Protein Data Bank*, PDB; www.pdbe.com), struktura enzima dostupna je u bazi pod kodom 5fpq, i napravljena je u rezoluciji 2,4 Å. Struktura inhibitora β-kariofilena preuzeta je iz PubChem baze (www.pubchem.com). Svi su podaci o enzimu i inhibitoru javno dostupni u navedenim bazama. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja korištena su dva besplatno dostupna web-servera: PatchDock i Haddock (29-32). Za parametrizaciju proteina i otapanje u vodi korišten je programski paket AmberTools (http://ambermd.org/). Za optimizaciju sustava i simulacije molekulske dinamike *(engl. Molecular dynamics,* MD) korišten je programski paket AMBER (http://ambermd.org/). Sve strukture vizualizirane su korištenjem softvera VMD (*engl.Visual Molecular Dynamics*).

3.3. Metode

3.3.1. Priprema molekula enzima i inhibitora

Trodimenzionalna struktura humane AChE preuzeta je iz javne baze podataka PDB (PDB_id 5fpq) (10). Prije uklapanja (*engl. docking*) obrisane su sve dvostruke konformacije aminokiselina arginina (Arg), glutamina (Gln), glutaminske kiseline (Glu), histidina (His) u A i B lancu molekule, kristalizirane vode i supstrat korišten pri postupku kristalizacije. Struktura inhibitora β-kariofilena preuzeta je iz PubChem-a, i u PDB zapis prebačena korištenjem softvera Open Babel (33, 34). Nakon toga pristupilo se ručnom uređivanju prije uklapanja

dodavanjem različitih brojeva uz atome inhibitora kako bi ih softver za uklapanje mogao razlikovati.

3.3.2. Metoda uklapanja

Metoda uklapanja ili predikcije služi za predviđanje i procjenjivanje najpovoljnijih položaja jedne molekule prema drugoj prilikom vezanja molekula u stabilan kompleks. Metoda uklapanja uvelike se primjenjuje za predviđanje vezanja proteinskih inhibitora i supstrata za molekule enzima. Prilikom računanja energije vezanja (ΔG_{vez}) koristi se pretpostavka da je slobodna energija vezanja određena kao pribrojena funkcija različitih komponenti koje doprinose jačini vezanja molekula (28).

$$\Delta G_{vez} = \Delta G_{otap} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{int} + \Delta G_{rot} + \Delta G_{t/r} + \Delta G_{vib} \quad (2)$$

U jednadžbi su prikazani neki od doprinosa slobodnoj energiji. Pribraja se više različitih doprinosa slobodnoj energiji od kojih su neki nastali uslijed uklanjanja liganda i pojedinih dijelova proteina iz otapala (ΔG_{otap}), ili kao konformacijske promjene u proteinu i ligandu (ΔG_{konf}), zatim specifične ligand-protein interakcije (ΔG_{int}), gubitak energije zbog smanjenja rotacijske entropije liganda i proteina (ΔG_{rot}) te gubitak translacijske i rotacijske entropije liganda ($\Delta G_{t/r}$) i promjena vibracijske entropije (ΔG_{vib}). Pojedine metode izostavljaju neke od ovih doprinosa zbog povećanja brzine (28).

Uklapanje molekula AChE i β-kariofilena napravljeno je na dva različita javno dostupna web-servera: PatchDock i Haddock. U PatchDock serveru omogućeno je uklapanje molekula na oba proteinska lanca (29, 30). Prilikom uklapanja na Haddock serveru bilo potrebno odabrati jedan lanac na kojem će se raditi uklapanje; odabran je lanac A (31, 32). Isto tako bilo je potrebno unijeti položaje aktivnih ostataka koji direktno sudjeluju u interakciji proteina i liganda (Tablica 1), podaci o tome preuzeti su sa UniProt (https://www.uniprot.org/) baze podataka.

Tablica 1: Položaj veznih mjesta enzima AChE i ligandi koji se vežu u tim mjestima.

Položaj	**Aminokiselinski ostatak**	**Ligand**
86	Trp	Galantamin, huperzin A
122	Gly	Huprin W (preko amidnog dušika), huperzin A
133	Tyr	Huperzin A
203	Ser	Huprin W
337	Tyr	Galantamin, huperzin A
439	Trp	Huprin W
447	His	Huprin W (preko karbonilnog kisika)

3.3.3. MD simulacije

Energijski najpovoljniji položaj parametriziran je pomoću modula *tleap* koji istovremeno dodaje i ione potrebne za neutralizaciju sustava i molekule vode, a svakom su aminokiselinskom ostatku dodijeljeni parametri potrebni za izvođenje simulacija molekulske dinamike. Voda je dodana u ljusku od 13 Å od najbliže udaljenosti površini proteina. Ubacivanjem iona natrija (Na^+), koji su stacionirani u blizini nabijenih aminokiselinskih ostataka na površini proteina, neutraliziran je negativan naboj sustava. Ioni natrija dodani su zamjenom molekule vode. Simulacije molekulske mehanike i dinamike izvršene su na računalnom klasteru Isabella koristeći grafičke procesorske jedinice koje omogućuju vrlo brzo izvođenje samih simulacija. Da bi se pristupilo MD simulacijama sustav je najprije potrebno dovesti u energetski minimum. To je učinjeno u tri ciklusa po 1500 minimizacijskih koraka. Nakon toga sustav je zagrijan na 300 K tijekom 100 ps da bi se doveo u fiziološke uvjete. Poslije uravnoteženja sustava pristupilo se produktivnim simulacijama molekulske dinamike u trajanju od 45 ns.

Analizom trajektorija pronađeni su aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u stabilizaciji inhibitora.

3.3.4. Vizualizacija molekula

VMD (inačica 1.9.3., University of Illinois at Urbana–Champaign) je računalni program za molekularno modeliranje i vizualizaciju (35). Razvijen je uglavnom kao alat za pregled i analizu rezultata simulacija molekularne dinamike te prikazuje većinu formata sa zapisivanje molekulskih koordinata. Program omogućuje različite načine za prikazivanje molekula i slike u ovom radu napravljene su pomoću VMD računalnog programa.

3.4. Statističke metode

Simulacije su se izvodile u kanonskom ansamblu (statistička interpretacija termodinamičkog sustava) koji predstavlja sva moguća stanja mehaničkog sustava u termodinamičkoj ravnoteži pri konstantnoj temperaturi.

4. REZULTATI

Metoda uklapanja korištena je kako bi se predvidio najpovoljniji položaj vezanja inhibitora β-kariofilena za enzim AChE. Korištena su dva različita javno dostupna servera. Rezultati dobiveni korištenjem servera PatchDock prikazuju na koji način se β-kariofilen veže za dimer AChE koji je fiziološki jako čest, dok su korištenjem Haddock servera dobiveni rezultati vezanja β-kariofilena za A proteinski lanac enzima AChE.

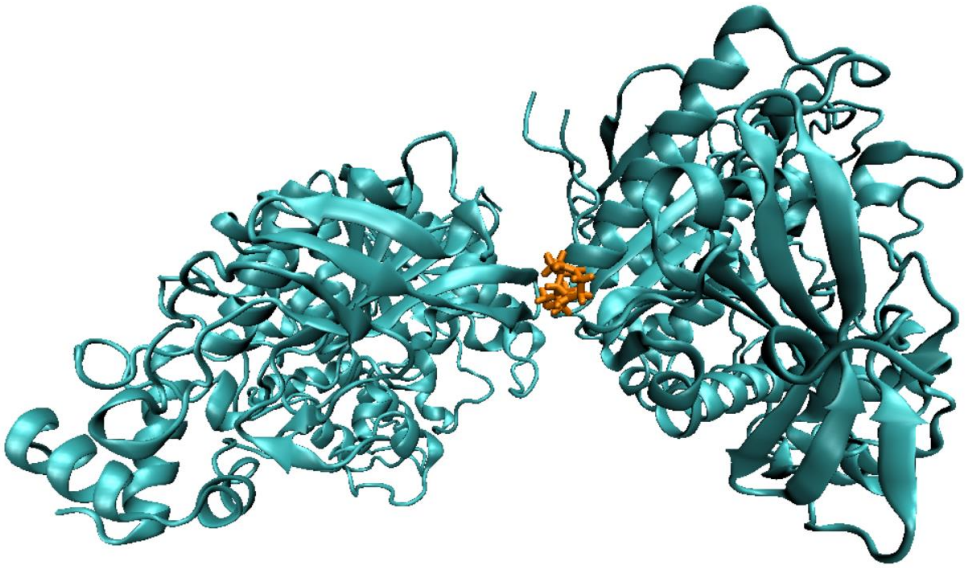
4.1. Rezultati dobiveni korištenjem PatchDock servera

U Tablici 2. prikazan je rezultat težinske funkcije Patchdock servera za 5 različitih položaja vezanja inhibitora β-kariofilena za enzim AChE. Najpovoljniji položaj ima najveći ostvareni rezultat prema ranije navedenoj formuli za izračun slobodne energije vezanja.

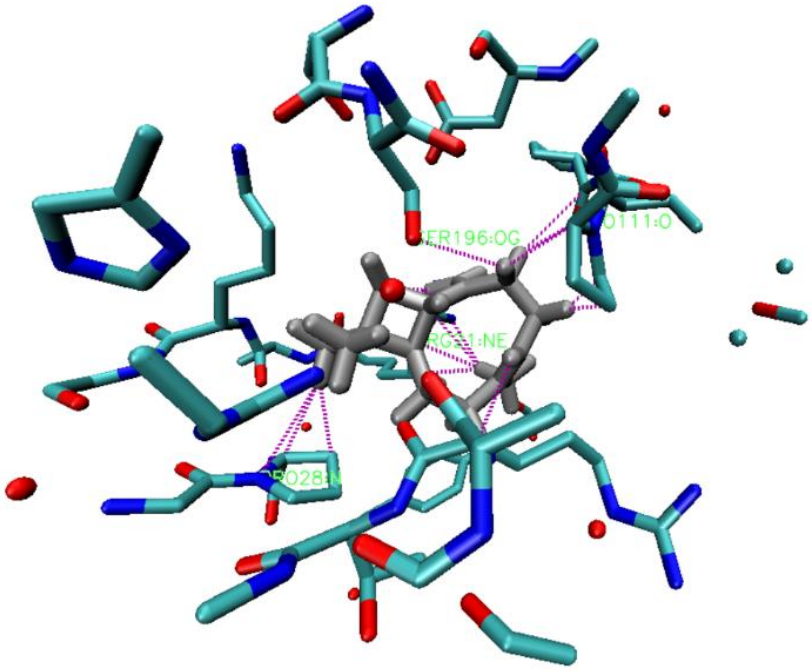
Tablica 2. Prikaz ukupnog rezultata za različite položaje vezanja inhibitora za enzim.

Rješenje br.	P1	P2	P3	P4	P5
Rezultat	4016	4014	3988	3844	3836

Na Slikama 5. – 9. prikazan je položaj inhibitora na enzimu (A ili B lanac) za 5 najpovoljnijih rješenja (a) te su prikazane interakcije inhibitora β-kariofilena i različith aminokiselinskih ostataka enzima AChE (b). U Tablicama 3. – 7. navedeni su aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakciju sa inhibitorom te duljina veze u angstremima pri graničnoj udaljenosti od 4.5 Å i graničnom kutu od 40°. Za oznake atoma molekula navedenih u tablicama u radu korišteno je uobičajeno obilježavanje u molekulskom modeliranju.



a.



b.

Slika 5. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za enzim AChE za rješenje P1. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje P1. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno) i dušika (plavo označeno). Sliku izradila autorica.

Tablica 3. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje P1.

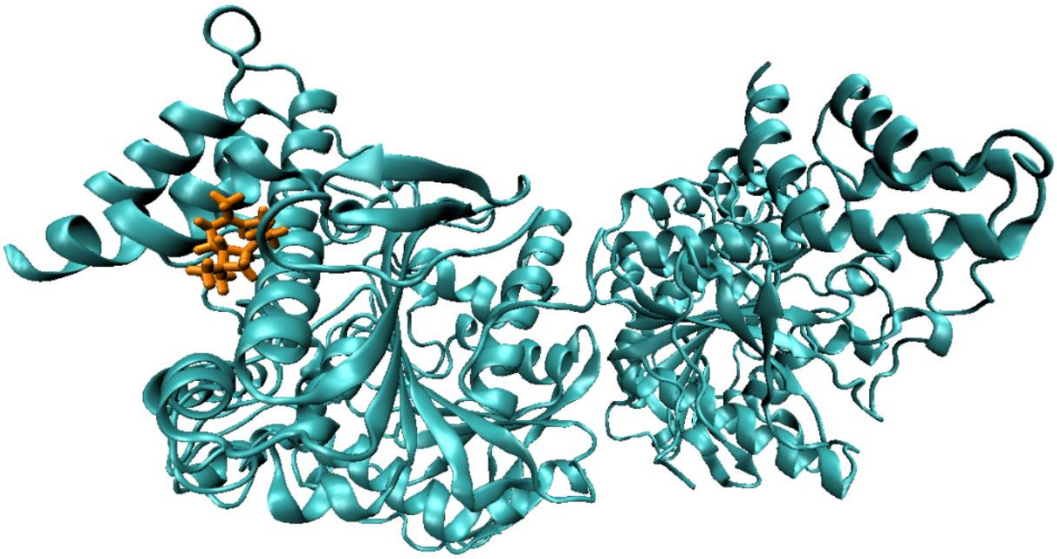
Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**	**Proteinski lanac**
Arg21:NE	2,56	A
Arg21:NE	2,92	A
Pro28:N	3,53	A
Pro111:O	2,87	B
Ser196:OE	3,64	B

Iz Tablice 3. i Slike 5. može se vidjeti da u energijski najpovoljnijem rješenju inhibitor ima interakciju sa oba lanca dimera AChE, najznačajniji rezultat za A lanac je interakcija s aminokiselinskim ostatkom arginina u mjestu 21, a za B lanac je to interakcija s aminokiselinskim ostatkom prolina u mjestu 111.

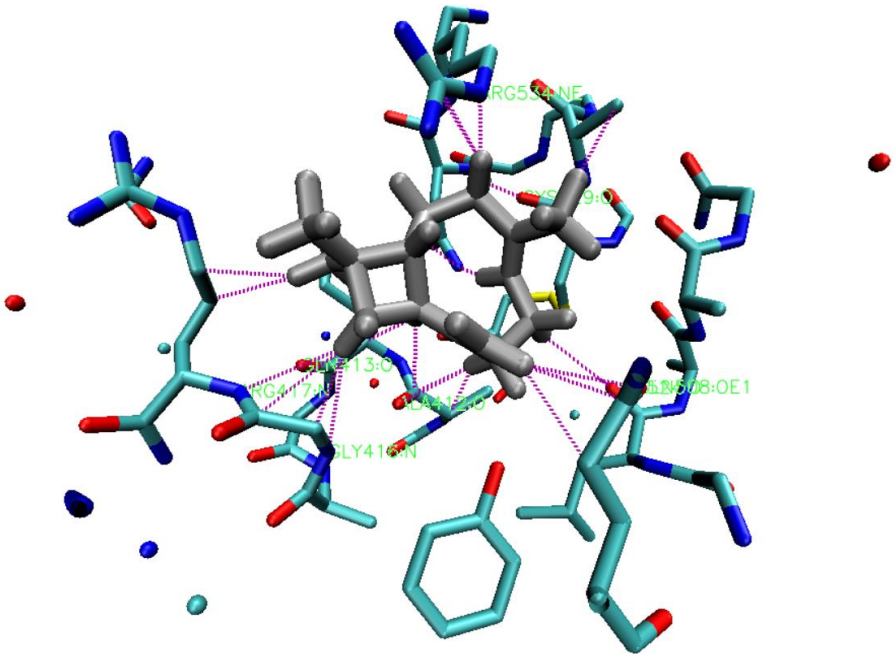
Tablica 4. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje P2.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**	**Proteinski lanac**
Gln508:OE1	2,65	A
Gln413:O	3,54	A
Arg534:NE	1,59	A
Arg417:N	3,14	A
Ala412:O	2,76	A
Gly416:N	3,16	A
Leu524:O	3,39	A
Cys529:O	3,22	A

Tablica 4. i Slika 6. pokazuju da u rješenju P2 inhibitor ima interakcije samo sa A lancem dimera AChE te je najznačajnija interakcija β-kariofilena s aminokiselinskim ostatkom arginina u mjestu 534.

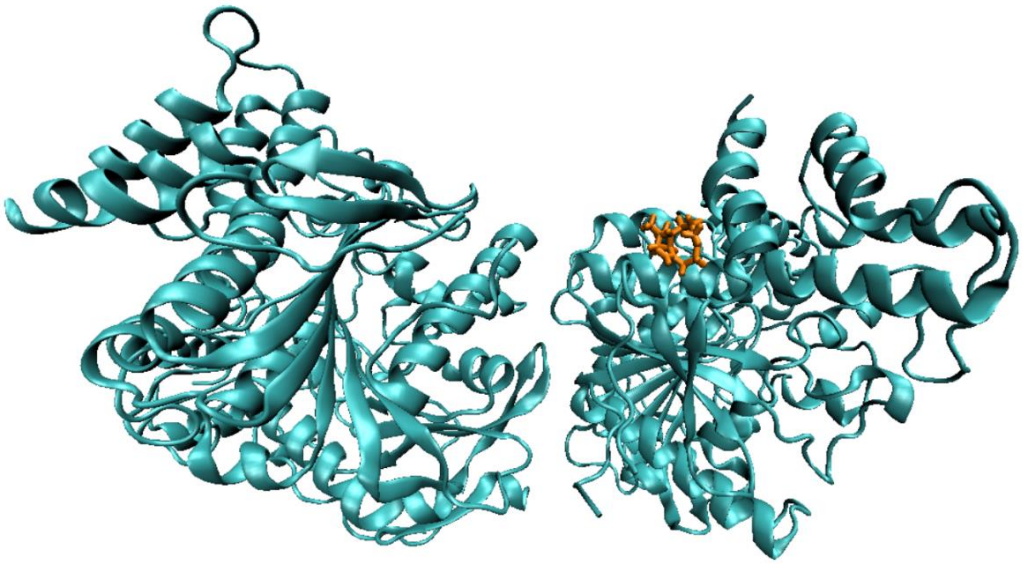


a.

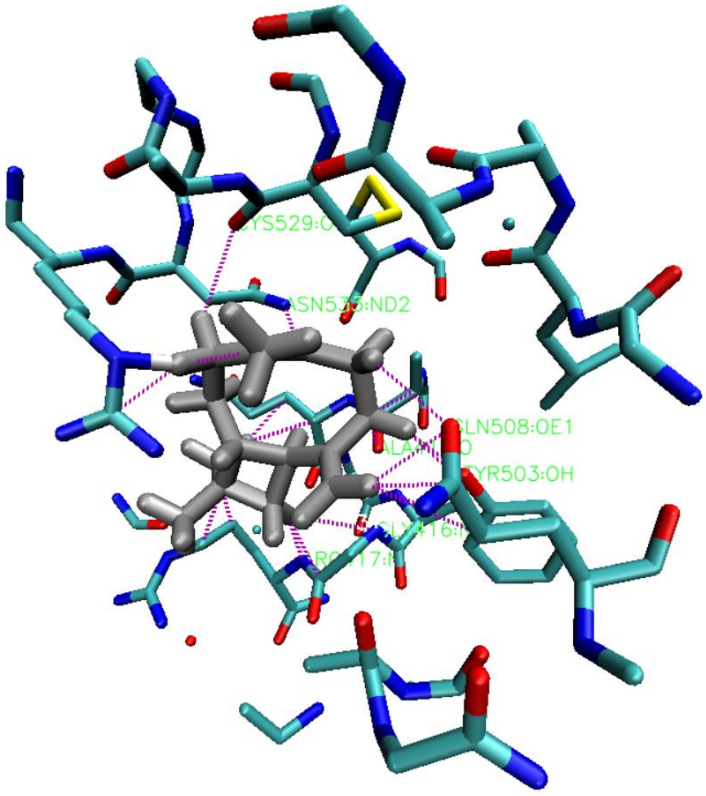


b.

Slika 6. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za enzim AChE za rješenje P2. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje P2. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno) i dušika (plavo označeno). Sliku izradila autorica.



a.



b.

Slika 7. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za enzim AChE za rješenje P3. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje P3. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno) i dušika (plavo označeno). Sliku izradila autorica.

Tablica 5. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje P3.

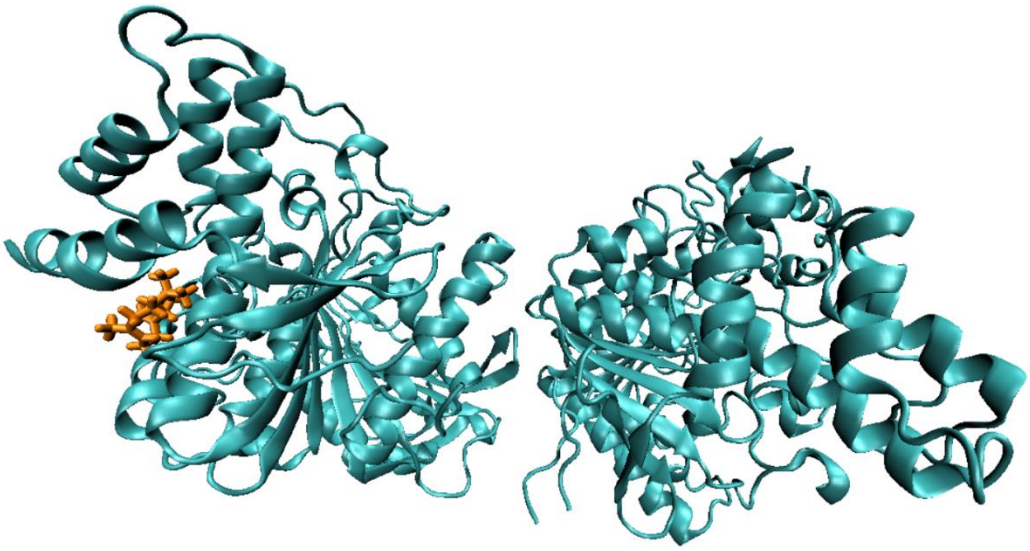
Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**	**Proteinski lanac**
Ala412:O	2,78	B
Gln508:OE1	2,80	B
Tyr503:OH	2,09	B
Arg417:N	3,14	B
Asn533:ND2	3,15	B
Cys529:O	3,21	B
Gly416:N	3,45	B

Za rješenje P3 inhibitor ostvaruje interakcije samo s lancem B dimera AChE, a najznačajniji rezultat je interakcija β-kariofilena s aminokiselinskim ostatkom tirozina u mjestu 503 što je vidljivo iz Tablice 5. i Slike 7.

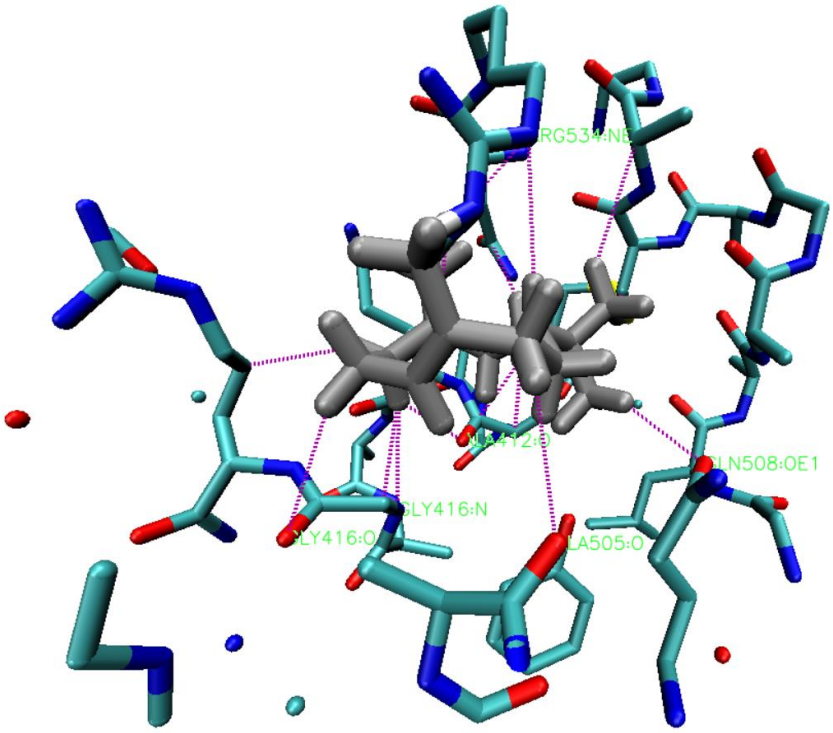
Tablica 6. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje P4.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**	**Proteinski lanac**
Gln508:OE1	2,81	A
Ala505:O	2,99	A
Ala412:O	3,24	A
Gly416:O	3,24	A
Gly416:N	3,31	A
Arg534:NE	2,53	A
Arg534:NE	3,26	A

Iz Tablice 6. i Slike 8. može se vidjeti da za rješenje P4 inhibitor ostvaruje interakcije samo sa A lancem dimera AChE te je najznačajnija interakcija β-kariofilena s aminokiselinskim ostatkom arginina u mjestu 534.

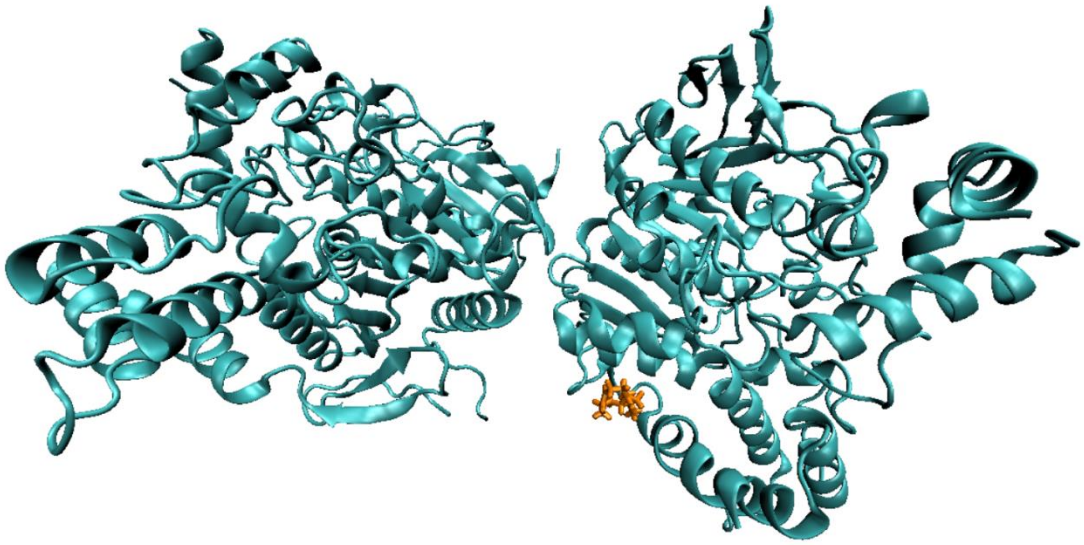


a.

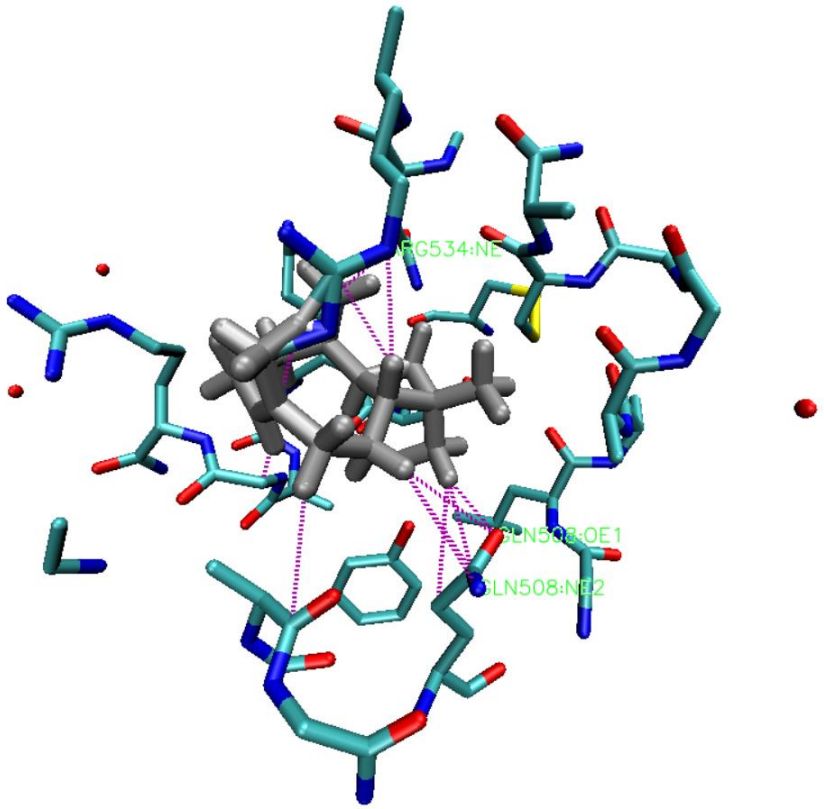


b.

Slika 8. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za enzim AChE za rješenje P4. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje P4. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno) i dušika (plavo označeno). Sliku izradila autorica.



a.



b.

Slika 9. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za enzim AChE za rješenje P5. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje P5. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno) i dušika (plavo označeno). Sliku izradila autorica.

Tablica 7. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje P5.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**	**Proteinski lanac**
Gln508:OE1	2,15	B
Gln508:NE2	3,35	B
Arg534:NE	3,04	B

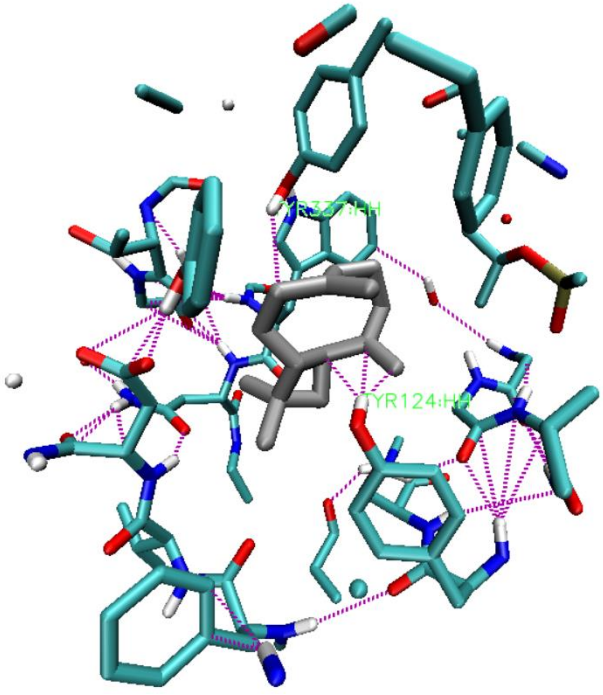
Tablica 7. i Slika 9. pokazuju ostvarene interakcije za rješenje P5. Inhibitor ostvaruje interakcije samo sa B lancem dimera AChE te je najznačajnija interakcija β-kariofilena s aminokiselinskim ostatkom glutamina u mjestu 508.

4.2. Rezultati dobiveni korištenjem Haddock servera

Korištenjem Haddock servera dobiveni su rezultati vezanja β-kariofilena za A proteinski lanac enzima AChE. Haddock je grupirao 178 struktura u 4 grupe, što predstavlja 89 % modela modificiranih vodom koje generira Haddock. Treba imati na umu da je trenutno najveći broj modela koji se razmatraju za grupiranje 200. Prema Haddock-u, prva grupa rezultata je najpouzdanija (Slika 10.). Z-rezultat, koji je u ovom slučaju -1 kcal/mol, pokazuje koliko se standardnih odstupanja od prosjeka nalazi prva grupa rezultata; što je negativniji, to bolje (31, 32). Za potrebe ovog diplomskog rada korištena je energijski najpovoljnija skupina rezultata s četiri rješenja.

Na Slikama 10. – 13. prikazan je položaj inhibitora na A lancu enzima za četiri najpovoljnija rješenja (H1, H2, H3, H4) (a) te su prikazane interakcije inhibitora β-kariofilena i različith aminokiselinskih ostataka enzima AChE (b). U Tablicama 8. – 11. navedeni su aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije s inhibitorom te duljina veze u angstremima pri graničnoj udaljenosti od 4.5 Å i graničnom kutu od 40°.

a.



b.

Slika 10. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za A lanac enzima AChE za rješenje H1. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje H1. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno), dušika (plavo označeno) i vodika (bijelo označeno). Sliku izradila autorica.

Tablica 8. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje H1.

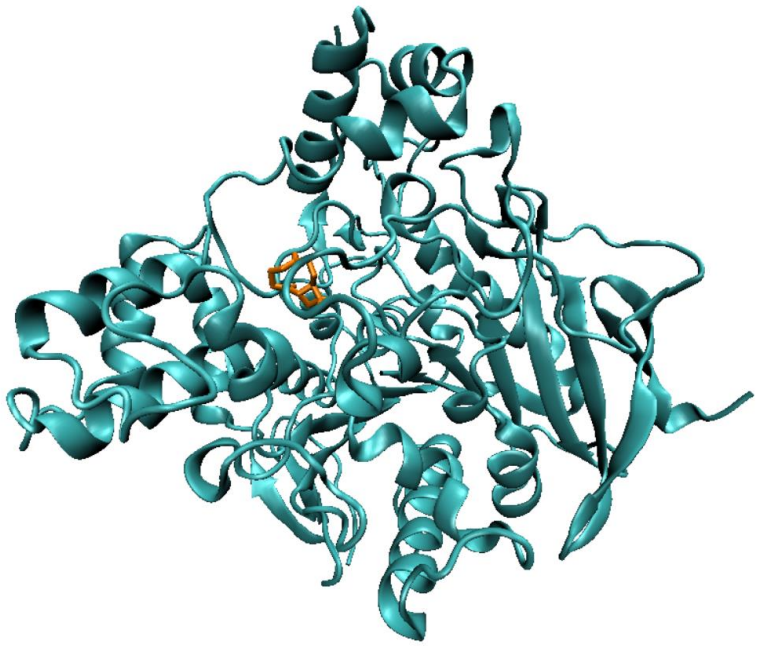
Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**
Tyr337:HH	2,84
Tyr124:HH	3,63
Tyr124:HH	3,45
Tyr124:HH	2,65
Gly121:HN	3,91

Iz Tablice 8. i Slike 10. može se vidjeti da u energijski najpovoljnijem rješenju inhibitor ostvaruje interakcije s dva aminokiselinska ostatka tirozina na mjestima 337 i 124. S aminokiselinskim ostatkom tirozina u mjestu 124 ostvarene su 3 različite interakcije.

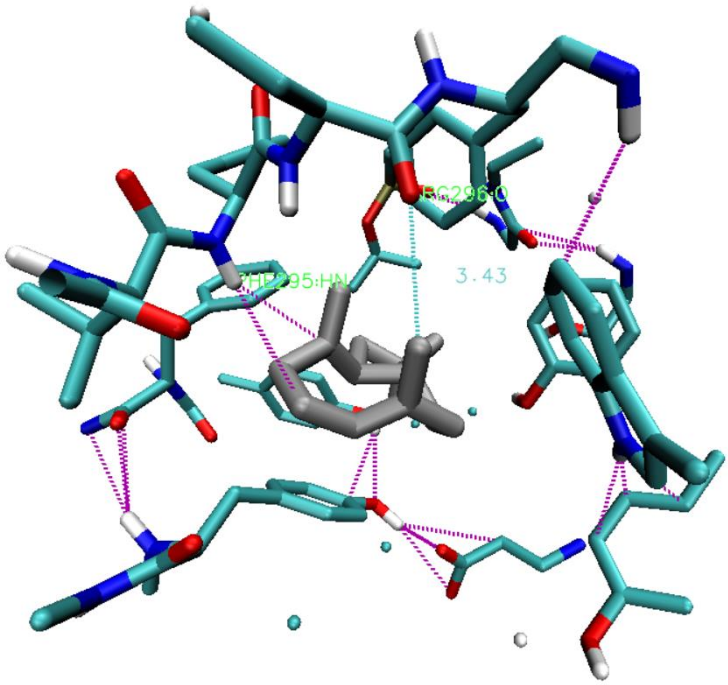
Tablica 9. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje H2.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**
Phe295:HN	2,90
Phe295:HN	2,40
Phe295:HN	3,42
Arg296:O	3,43

U Tablici 9. i na Slici 11. prikazane su ostvarene interakcije inhibitora i aminokiselinskih ostataka enzima AChE za rješenje H2. Inhibitor ostvaruje interakcije sa aminokiselinskim ostacima fenilalanina i argininom. Sa aminokiselinskim ostatkom fenilalanina u mjestu 295 ostvarene su 3 različite interakcije.



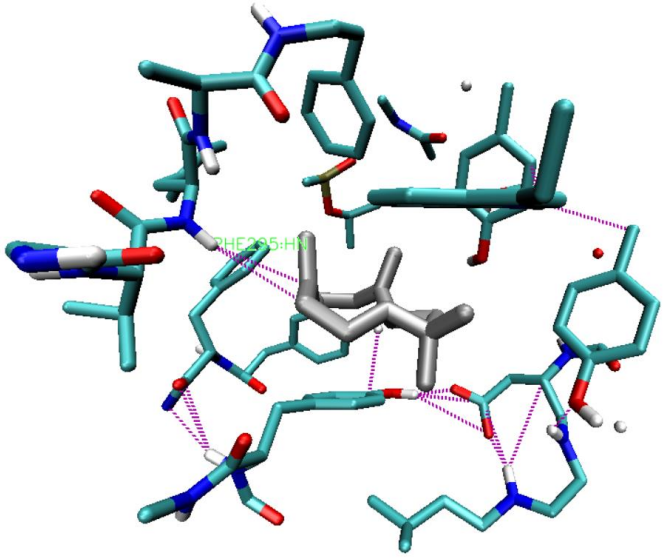
a.



b.

Slika 11. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za A lanac enzima AChE za rješenje H2. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje H2. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno), dušika (plavo označeno) i vodika (bijelo označeno). Sliku izradila autorica.

a.



b.

Slika 12. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za A lanac enzima AChE za rješenje H3. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje H3. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno), dušika (plavo označeno) i vodika (bijelo označeno). Sliku izradila autorica.

Tablica 10. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje H3.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**
Phe295:HN	3,59
Phe295:HN	3,18

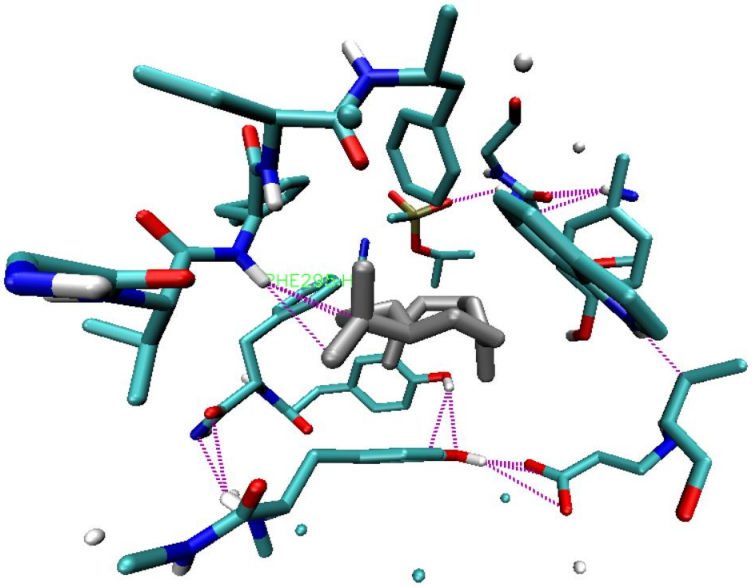
Iz Tablice 10. i Slike 12. može se vidjeti kako za rješenje H3 inhibitor β-kariofilen ostvaruje interakcije samo sa aminokiselinskim ostatkom fenilalanina u mjestu 295.

Tablica 11. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora za rješenje H4.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**
Phe295:HN	3,21
Phe295:HN	2,95
Phe295:HN	2,58

Tablica 11. i Slika 13. pokazuju ostvarene interakcije inhibitoa i aminokiselinskih ostataka za rješenje H4. Inhibitor β-kariofilen ostvaruje 3 različite interakcije samo sa aminokiselinskim ostatkom fenilalanina u mjestu 295.

a.



b.

Slika 13. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za A lanac enzima AChE za rješenje H4. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE za rješenje H4. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno), dušika (plavo označeno) i vodika (bijelo označeno). Sliku izradila autorica.

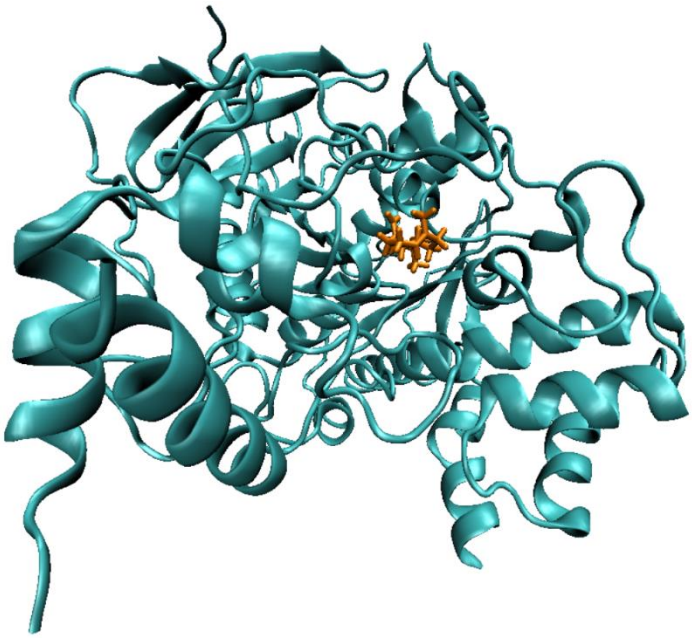
4.3. Rezultati MD simulacije

Za ulaz u MD simulacije odabrana je prva struktura iz energijski najpovoljnijeg klastera koji je dao server za dokiranje Haddock. Nakon 45 ns MD simulacije na isti način su utvrđene interakcije koje inhibitor ima sa aminokiselinama u enzimu. Rezultati su prikazani na Slici 14. i u Tablici 12.

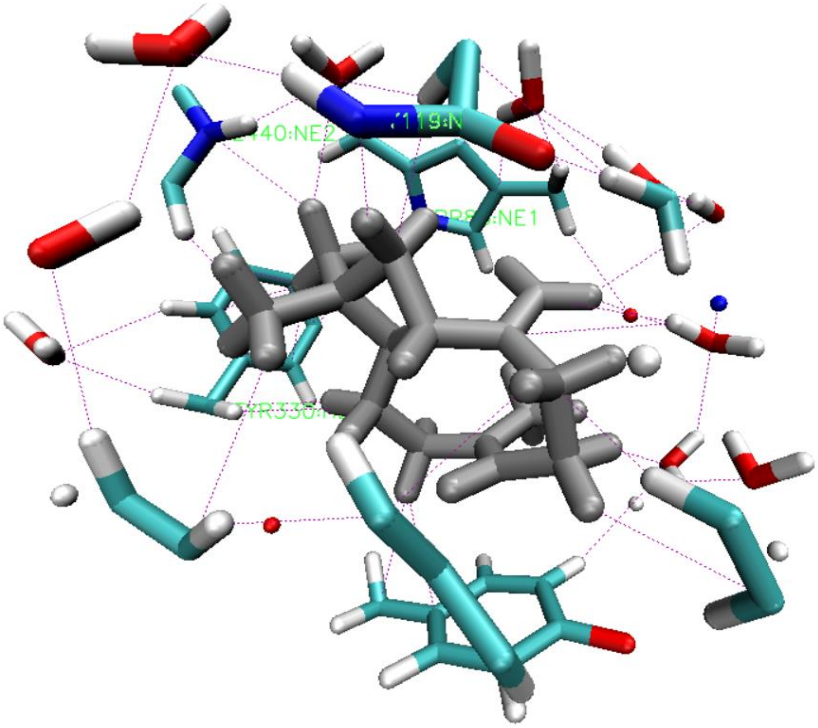
Tablica 12. Aminokiselinski ostaci koji sudjeluju u vezanju inhibitora.

Aminokiselinski ostatak	**Duljina veze/ Å**
Trp86:NE1	2,80
Gly122:N	3,43
Gly121:HA2	3,13
His443:NE2	2,61
Tyr124:HD2	3,03
Tyr337:C6	2,87
Ser125:HB2	2,07

Nakon provedenih kratkih MD simulacija inhibitor je ostvario veze s aminokiselinama: triptofan u mjestu 86, glicin u mjestima 121 i 122, histidin u mjestu 443, serin u mjestu 125 te tirozin u mjestima 124 i 337.



a.



b.

Slika 14. a) Položaj vezanja β-kariofilena (narančasto označeno) za A lanac enzima AChE. b) Prikaz ostvarenih interakcija (ljubičasto označeno) između β-kariofilena i aminokiselinskih ostataka AChE. Različitim bojama prikazani su atomi kisika (crveno označeno), dušika (plavo označeno) i vodika (bijelo označeno). Sliku izradila autorica.

5. RASPRAVA

Predmet istraživanja diplomskog rada bilo je molekulsko modeliranje inhibicije enzima AChE korištenjem kemijskog spoja β-kariofilena kao inhibitora. Cilj istraživanja bio je korištenjem računalnih metoda uklapanja (dokiranja) ispitati inhibiciju acetilkolinesteraze, ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu i metodama molekulske dinamike potvrditi sudjeluju li aminokiselinski ostaci dobiveni serverima za predikciju položaja doista u vezanju inhibitora za enzim. Za metodu dokiranja korištena su dva web-servera koji daju zanimljive rezultate. Server za molekulsko uklapanje PatchDock koristio je prilikom uklapanja sa β-kariofilenom molekulu AChE u obliku dimera, koji je fiziološki jako čest. Takvi rezultati iako rađeni u fiziološki relevantnijim uvjetima nisu uputili na vezanje inhibitora na aminokiselinske ostatke za koje je eksperimentalno utvrđeno da imaju važnu ulogu pri vezanju liganada.

Iako je uklapanje koje je provedeno Haddock serverom imalo nešto lošije početne postavke, jer je bilo moguće postaviti samo jedan lanac enzima za pronalazak energijski najpovoljnijih položaja, predviđanja su dala puno bolje rezultate koji su u skladu s eksperimentalnim podacima. Tako je već u nekoliko studija pokazano da se inhibicija događa baš na tim veznim mjestima: Gly122 i Tyr337 (36, 37).

Proučavanjem interakcija koje se pojavljuju tijekom reaktivacije AChE inhibirane nekim ireverzibilnim inhibitorom, kao što su organofosforni spojevi, najčešće je korištena računalna metoda molekularnog uklapanja. Danas još uvijek nije otkriven univerzalni reaktivator koji bi učinkovito reaktivirao inhibirani enzim. Metoda predviđa vjerojatni položaj i orijentaciju različitih spojeva u aktivnome mjestu enzima simulacijom različitih sila (van der Waalsove sile, električne sile ili vodikove veza) što omogućuje određivanje i formuliranje strukturnih karakteristika eventualno djelotvornih reaktivatora enzima (9). U ovom slučaju prognoziranje interakcija ne uzima u obzir moguće pomake u položaju aminokiselina u aktivnom mjestu odnosno u perifernom alosteričkom mjestu enzima AChE. Korištenje ove računalne metode postala je neizostavno i u dizajnu potencijalnih lijekova s ciljanim djelovanjem na inhibiciju enzima AChE, koji bi se koristili u liječenju bolesti kao što su AD i Parkinsonova bolest (9).

Iz upravo navedenog razloga nepomične strukture inhibitora i enzima, pristupljeno je kratkim simulacijama molekulske dinamike te je na taj način osigurana fleksibilnost i proteina

i inhibitora, a budući da je sustav otopljen u vodi moguće je promatrati utjecaj vode na vezanje inhibitora te utjecaj ostalih aminokiselinskih ostataka koji okružuju aktivno mjesto. Na primjeru aminokiselinskog ostatka serina može se vidjeti utjecaj vode na vezanje inhibitora. Interakcija između serina i inhibitora nije vidljiva u početnoj strukturi, dok se interakcija između serina u mjestu 125 i inhibitora pojavljuje u konačnoj strukturi ali kao vodom posredovana vodikova veza. Početna struktura za izvođenje simulacija molekulske dinamike odabrana je ona za koju je računalni sever odredio najbolji ukupni rezultat, odnosno najnižu energiju vezanja, a važno je napomenuti da je u početnoj strukturi inhibitor već uklopljen u vezno mjesto. Analizom posljednje strukture molekulske dinamike utvrđeno je da aminokiselinski ostaci enzima koji koordiniraju inhibitor odgovaraju onima u početnoj strukturi: Tyr124, Tyr337 i Gly121. Na taj je način potvrđena točnost sustava za predikciju položaja vezanja, jer bi se u suprotnom inhibitor počeo udaljavati od aktivnog mjesta i izgubio koordinaciju sa početno predviđenim aminokiselinskim ostacima.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- energijski najpovoljniji položaj dobiven računalnim metodama uklapanja poklapa se sa eksperimentalno utvrđenim u veznim mjestima Gly122 i Tyr337.
- metodom molekulske dinamike inhibitor je koordiniran aminokiselinskim ostacima koji odgovaraju onima u početnoj strukturi: Tyr124, Tyr337 i Gly121.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Metodama molekulskog modeliranja ispitati inhibiciju acetilkolinesteraze, ispitati energijski najpovoljnije položaje inhibitora u enzimu i metodama molekulske dinamike pronaći aminokiselinske ostatke koji sudjeluju u vezanju inhibitora.

Nacrt studije: Istraživanje je napravljeno kao *in silico* studija – izgradnja računalnog modela enzima i inhibitora.

Materijali i metode: Podaci o enzimu AChE preuzeti su baze PDB, a podaci o β-kariofilenu preuzeti su iz PubChem baze. Za predikciju energijski najpovoljnijeg položaja korištena su dva besplatno dostupna web-servera: PatchDock i Haddock. Za parametrizaciju proteina i otapanje u vodi korišten je programski paket AmberTools. Za optimizaciju sustava i MD simulacije korišten je programski paket AMBER. Sve strukture vizualizirane su korištenjem softvera VMD.

Rezultati: Rezultati dobiveni korištenjem servera PatchDock prikazuju na koji način se β-kariofilen veže za dimer AChE te nisu uputili na vezanje inhibitora za aminokiselinske ostatke za koje je eksperimentalno utvrđeno da imaju važnu ulogu pri vezanju liganda. Korištenjem Haddock servera dobiveni su rezultati vezanja β-kariofilena za A proteinski lanac enzima AChE, a rezultati su u skladu s eksperimentalnim podacima. MD simulacijama utvrđeno je da aminokiselinski ostaci enzima koji koordiniraju inhibitor odgovaraju onima u početnoj strukturi (rješenje br. 1, Haddock).

Zaključak: Energijski najpovoljniji položaj dobiven računalnim metodama uklapanja poklapa se sa eksperimentalno utvrđenim u veznim mjestima Gly122 i Tyr337. Metodom molekulske dimanike inhibitor je koordiniran aminokiselinskim ostacima koji odgovaraju onima u početnoj strukturi: Tyr124, Tyr337 i Gly121.

Ključne riječi: acetilkolinesteraza, β-kariofilen, inhibicija, MD simulacija, molekulsko uklapanje

8. SUMMARY

Molecular modelling of acetylcholinesterase

Objectives: Use molecular modeling methods to examine acetylcholinesterase inhibition, to examine the most energetically favorable positions of inhibitors in the enzyme and by using the molecular dynamics methods find amino acid residues involved in the binding of inhibitors.

Study design: The research was done as an *in silico* study - building a computer model of enzymes and inhibitors.

Materials and methods: AChE enzyme data were taken from the PDB base and β-caryophyllene data were taken from the PubChem base. Two free web servers were used to predict the most energy-efficient position: PatchDock and Haddock. The AmberTools software package was used for protein parameterization and dissolution in water. The AMBER software package was used for system optimization and MD simulation. All structures were visualized using VMD software.

Results: The results obtained using the PatchDock server show how β-caryophyllene binds to the AChE dimer and did not suggest binding of inhibitors to amino acid residues that have been experimentally determined to play an important role in ligand binding. Using a Haddock server, the results of β-caryophyllene binding to the A protein chain of the AChE enzyme were obtained, and the results are consistent with experimental data. MD simulations showed that the amino acid residues of the enzyme coordinating enzymes correspond to those in the initial structure (solution No. 1, Haddock).

Conclusion: The most energy - efficient position obtained by molecular docking methods matches with positions experimentally determined at the Gly122 and Tyr337 binding sites. Using the molecular dynamics method, the inhibitor is coordinated with amino acid residues corresponding to those in the initial structure: Tyr124, Tyr337 and Gly121.

Keywords: acetylcholinesterase, β-caryophyllene, inhibition, MD simulation, molecular docking

9. LITERATURA

1. Štraus B, Petrik J. Enzimi. U: Čvorišćec D, Čepelak I (ur.). Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 245-313.
2. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: mehanizam djelovanja. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 51-62.
3. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. 2015;59:1-41. doi:10.1042/bse0590001.
4. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: kinetika. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 62-75.
5. Yun KI, Han TS. Relationship between enzyme concentration and Michaelis constant in enzyme assays. Biochimie. 2020 Sep;176:12-20. doi: 10.1016/j.biochi.2020.06.002.
6. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. Molecules. 2017;22(7):1192. doi:10.3390/molecules22071192.
7. Kennelly PJ, Rodwell VW. Enzimi: regulacija enzimske aktivnosti. U: Lovrić J, Sertić J (ur.). Harperova ilustrirana biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 75-84.
8. Chen VP, Luk WK, Chan WK, Leung KW, Guo AJ, Chan GK et al. Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation. Front Mol Neurosci. 2011 Oct 25;4:36. doi: 10.3389/fnmol.2011.00036.
9. Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z. Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija. Arh Hig Rada Toksikol. [Internet]. 2011 [pristupljeno 23.06.2021.];62(2):175-189. https://doi.org/10.2478/10004-1254-62-2011-2107
10. Allgardsson A, Berg L, Akfur C, Hörnberg A, Worek F, Linusson A, Ekström FJ. Structure of a prereaction complex between the nerve agent sarin, its biological target acetylcholinesterase, and the antidote HI-6.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2016. PMID: 27140636 doi: 10.1073/pnas.1523362113
11. Lionetto MG, Caricato R, Calisi A, Giordano ME, Schettino T. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. Biomed Res Int. 2013;2013:321213. doi: 10.1155/2013/321213.

12. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Curr Neuropharmacol. 2013;11(3):315-335. doi:10.2174/1570159X11311030006
13. Lushchekina SV, Masson P. Slow-binding inhibitors of acetylcholinesterase of medical interest. Neuropharmacology. 2020 Oct 15;177:108236. PMID: 32712274.
14. Rotundo RL. Biogenesis, assembly and trafficking of acetylcholinesterase. J Neurochem. 2017 Aug;142 Suppl 2(Suppl 2):52-58. doi: 10.1111/jnc.13982.
15. Mushtaq G, Greig NH, Khan JA, Kamal MA. Status of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2014;13(8):1432-1439. doi:10.2174/1871527313666141023141545
16. Silman I, Sussman JL. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? Chem Biol Interact. 2008 Sep 25;175(1-3):3-10. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.035. PMID: 18586019.
17. Galimberti D, Scarpini E. Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Expert Opin Investig Drugs. 2016 Oct;25(10):1181-7. doi: 10.1080/13543784.2016.1216972.
18. Dos Santos TC, Gomes TM, Pinto BAS, Camara AL, Paes AMA. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. Front Pharmacol. 2018 Oct 18;9:1192. doi: 10.3389/fphar.2018.01192.
19. Kostelnik A, Pohanka M. Inhibition of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by a Plant Secondary Metabolite Boldine. BioMed Res Int vol. 2018 9634349. 5 Apr. 2018, doi:10.1155/2018/9634349
20. Pitchai A, Rajaretinam RK, Mani R, Nagarajan N. Molecular interaction of human acetylcholinesterase with trans-tephrostachin and derivatives for Alzheimer's disease. Heliyon. 2020;6(9):e04930. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04930. PMID: 32995619; PMCID: PMC7501440.
21. Cavdar H, Senturk M, Guney M, et al. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies. J Enzyme Inhib Med Chem. 2019;34(1):429-437. doi:10.1080/14756366.2018.1543288
22. Fidyt K, Fiedorowicz A, Strządała L, Szumny A. β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. Cancer Med. 2016;5(10):3007-3017. doi: 10.1002/cam4.816. PMID: 27696789; PMCID: PMC5083753.

23. Yang J, Li Z, Guo L, Du J, Bae HJ. Biosynthesis of β-caryophyllene, a novel terpene-based high-density biofuel precursor, using engineered Escherichia coli. Renewable Energy. 2016; 99: 216–223.
24. Machado KDC, Islam MT, Ali ES, Rouf R, Uddin SJ, Dev S, et al. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. Phytother Res. 2018 Dec;32(12):2376-2388. doi: 10.1002/ptr.6199. PMID: 30281175.
25. Yoo HJ, Jwa SK. Inhibitory effects of β-caryophyllene on Streptococcus mutans biofilm. Arch Oral Biol. 2018;88:42-46. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.01.009. PMID: 29407750.
26. Koyama S, Purk A, Kaur M, Soini HA, Novotny MV, Davis K, Kao CC, Matsunami H, Mescher A. Beta-caryophyllene enhances wound healing through multiple routes. PLoS One. 2019;14(12):e0216104. doi: 10.1371/journal.pone.0216104. PMID: 31841509; PMCID: PMC6913986.
27. Thurakkal L, Singh S, Roy R, Kar P, Sadhukhan S, Porel M. An in-silico study on selected organosulfur compounds as potential drugs for SARS-CoV-2 infection via binding multiple drug targets. Chem Phys Lett [Internet]. 2021;763:138193.
28. Brkić H. Proučavanje o željezu ovisnih dioksigenaza računalnim metodama. Doktorska disertacija. Prirodoslovno matematički Fakultet, Fizički odsjek, Zagreb. 2014.
29. Duhovny D, Nussinov R, Wolfson HJ. Efficient Unbound Docking of Rigid Molecules. In Gusfield et al., Ed. Proceedings of the 2'nd Workshop on Algorithms in Bioinformatics(WABI) Rome, Italy, Lecture Notes in Computer Science. 2002; 2452, pp. 185-200.
30. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. Nucl. Acids. Res. 2005;33: W363-367.
31. Honorato RV, Koukos PI, Jimenez-Garcia B, Tsaregorodtsev A, Verlato M, Giachetti A, et al. Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC Ecosystem. Frontiers Mol. Biosci., 2021; 8, fmolb.2021.729513.
32. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastritis PL, Karaca E, et al. The HADDOCK2.2 webserver: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. J. Mol. Biol., 2015; 428, 720-725.

33. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. J. Cheminf. 2011; 3, 33. doi:10.1186/1758-2946-3-33
34. The Open Babel Package, version 2.3.1 http://openbabel.org (accessed April 2021)
35. Humphrey, William; Dalke, Andrew; Schulten, Klaus. VMD: Visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics. 1996;14 (1): 33–38. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID 8744570.
36. Nachon F, Carletti E, Ronco C, Trovaslet M, Nicolet Y, Ludovic J, Renard PY; Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. Biochem J 1 August 2013; 453 (3): 393–399. doi: https://doi.org/10.1042/BJ20130013
37. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Love J, Franklin MC, Height JJ. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. J Med Chem. 2012 Nov 26;55(22):10282-6. doi: 10.1021/jm300871x. Epub 2012 Nov 12. PMID: 23035744

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Anamaria Šokčević

Datum i mjesto rođenja:

5. veljače 1997., Slavonski Brod

Adresa:

Kupina 51, 35221 Velika Kopanica

Broj mobitela:

097/775-1190

Obrazovanje:

2011. – 2015. Gimnazija „Matija Mesić“, Slavonski Brod

2015. – 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku

2019. – 2021. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku