

Det helsevitenskapelige fakultet

Institutt for Farmasi

Molekylmodelleringsstudium av G-protein koblet østrogenreseptor (GPER)

Maria Smith

Masteroppgave i farmasi - Mai 2017

Forord

Denne masteroppgaven ble utført i tidsrommet 2016/2017 ved Institutt for Medisinsk Biologi i samarbeid med Institutt for Farmasi (IFA) ved Universitetet i Tromsø.

Først og fremst vil jeg benytte anledningen til å vise min takknemlighet til min fantastisk dyktige hovedveileder, professor Aina Westrheim Ravna, for sin engasjerte assistanse, veiledning og verdifulle tilbakemeldinger i løpet av denne studien. Med hjelp av min veileder har jeg fordypet min kunnskap og kjennskap til molekylmodellering. Spesielt vil jeg takke henne for å ha tildelt meg en bærbar PC for mitt lab-arbeid. Det har vært en ære å jobbe med henne.

Jeg har også lyst til å takke min biveileder, professor Georg Sager, for fantastisk veiledning, faglige innspill og verdifulle tilbakemeldinger i løpet denne studien.

Til slutt vil jeg også rette en stor takk til min fantastiske familie; faren min Joseph Smith og brødrene mine David og Ehsan Smith med sin støtte, råd og påminnelse på at jeg kommer til å klare dette alle disse årene. Ikke minst har de oppmuntret meg til å studere farmasi. Samtidig har jeg også lyst til å nevne min avdøde mor som ønsket at jeg skulle studere innen helse. Hun har vært en inspirasjon for meg. Gjennom tunge tider har hennes minner gitt meg styrke til å fortsette. Håper hun er stolt av meg nå!

Tromsø, Mai 2017

Maria Smith

Sammendrag

G-protein koblet østrogenreseptor (GPER) har vist å ha en fysiologisk rolle i det reproduktive systemet, nervesystemet, endokrine systemet, immunsystemet og karsystemet. Den har også patofysiologisk rolle i flere forskjellige sykdommer inkludert kreft. G-protein koblet østrogenreseptor har blitt identifisert i nesten alle systemer i kroppen. Dermed er det en stor interesse for å få kjennskap til G-protein koblet østrogenreseptor sin 3D struktur og funksjonsegenskap for å kunne utvikle fremtidige legemidler.

Homologimodellering er en *in silico* metode som brukes til å forutsi 3D strukturen av en ukjent proteinstruktur. Krystallstrukturen til G-protein koblet østrogenreseptor og ligand bindingssetet hadde enda ikke blitt eksperimentelt identifisert og fastslått ved start av denne studien. Tre G-protein koblet østrogenreseptor modeller ble bygd basert på tre kjente krystallstrukturer (PDB ID: 4YAY, 4ZUD og 4XT1). Modellenes evne til å skille mellom agonister og decoys ble testet og analysert ved å bruke Receiver Operating Characteristics (ROC) kurve. Basert på ROC-kurveanalyser, ble den modellen med størst evne til å skille mellom agonister og decoys valgt.

En virtuell ligand screening (VLS) prosedyre ble anvendt på den beste modellen (4YAY-basert modell) for å identifisere potensielle bindingsforbindelser som kan bli brukt som G-protein koblet østrogenreseptor agonister. I denne studien ble det foreslått 20 nye agonister basert på homologimodellering og virtuell ligand screening. Disse forbindelsene kan bli testet *in vitro* og eventuelt bli brukt som potensielle legemiddelkandidater.

Innholdsfortegnelse

FORORD	II
SAMMENDRAG	IV
INNHOLDSFORTEGNELSE	VI
FIGURLISTE	VIII
TABELLISTE	X
FORKORTELSESLISTE	XI
1 INTRODUKSJON	1
1.1 ENDOKRINOLOGI.....	1
1.1.1 Steroidhormoner	2
1.2 ØSTROGEN	3
1.3 FARMAKODYNAMIKK.....	5
1.3.1 Målmolekyler	6
1.3.2 Legemiddel-reseptor interaksjoner	7
1.3.3 Affinitet.....	9
1.4 PROTEINER OG PROTEIN STRUKTUR.....	10
1.5 G-PROTEIN KOBLEDE RESEPTORER	12
1.5.1 Klasse A GPCR.....	13
1.6 G-PROTEIN KOBLET ØSTROGENRESEPTOR	14
1.6.1 GPER Struktur	15
1.7 MOLEKYLMODELLERING	16
1.8 HOMOLOGIMODELLERING	17
1.8.1 Templat identifisering	19
1.8.2 Target-templat alignment	20
1.8.3 Modellbygging	20
1.8.4 Modelljustering	20
1.8.5 Modellvalidering	21
1.9 DOKKING OG SCORING	21
1.9.1 Receiver operating curves (ROC)	22
1.10 VIRTUELL SCREENING (VS).....	24
2 FORMÅL	25
3 METODER	26
3.1 PROGRAMVARER.....	26

3.1.1	Molsoft Internal Coordinates Mechanics (ICM) (Versjon 3.8.5)	26
3.1.2	Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	26
3.2	DATABASER	26
3.2.1	The Protein Data Bank (PDB)	26
3.2.2	Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB)	27
3.2.3	ChEMBL	27
3.2.4	IUPHAR/BSP Guide to Pharmacology	27
3.2.5	PubChem	27
3.2.6	eMolecules	28
3.3	HOMOLOGIMODELLERING	28
3.3.1	Templat identifisering	28
3.3.2	Target- templat alignment	30
3.3.3	Modellbygging av GPER	34
3.3.4	Modelljustering	34
3.3.5	Modellvalidering	34
3.4	DOKKING OG SCORING	35
3.4.1	Datsett med agonister og decoys	35
3.4.2	Ligand og reseptor forberedelse	35
3.4.3	Identifisering av ligand-bindingssete	35
3.4.4	Dokking av agonister	36
3.4.5	ROC- kurve	36
3.5	VIRTUELL LIGAND SCREENING (VLS)	36
4	RESULTATER OG DISKUSJON	36
4.1	HOMOLOGIMODELLERING	37
4.2	DOKKING OG SCORING	44
4.3	VIRTUELL LIGAND SCREENING (VLS)	51
5	FEILKILDER	56
6	KONKLUSJON	57
7	FREMTIDSPERSPEKTIV	58
	LITTERATURREFERANSER	59
	APPENDIKS	65
A.1	AKTIVE OG INAKTIVE FORBINDELSER GENERERT FRA PUBCHEM	65

Figurliste

- Figur 1** Østrogensyntesen i eggstokkene.
- Figur 2** Aminosyrer i en polypeptidkjede med hovedkjede vinklene Ψ og Φ .
- Figur 3** Klassisk modell av Klasse A/ Rhodopsin GPCR i cellemembranen.
- Figur 4** Non-genome og genome østrogen signaliseringsveier.
- Figur 5** Aminosyrebasert diagram av G-protein koblet østrogenreseptor.
- Figur 6** Trinnene i homologimodellering.
- Figur 7** Grafisk fremstilling av en ROC-kurve.
- Figur 8** Sekvensalignment av GPER og 4YAY som ble brukt til homologimodellering.
- Figur 9** Sekvensalignment av GPER og 4ZUD som ble brukt til homologimodellering.
- Figur 10** Sekvensalignment av GPER og 4XT1 som ble brukt til homologimodellering.
- Figur 11** Ramachandran Plot av alle tre modellene.
- Figur 12** ERRAT plot for 4YAY-, 4ZUD- og 4XT1- basert modell.
- Figur 13** Modeller som er superponert deres korresponderende templat.
- Figur 14** Tre modeller superponert.
- Figur 15** Bindingssetet til 4YAY-basert modell vist i ribbon og elektrostatiske potensial.
- Figur 16** Forbindelse nr. 149 hadde den laveste score verdien av de 15 dokede agonister.
- Figur 17** 2D ligandinteraksjons diagram for forbindelse 149.
- Figur 18** Antatt bindingsinteraksjon mellom forbindelse nr. 149 og GPER.
- Figur 19** ROC-kurve av 4YAY-basert modell (øverst), 4ZUD-basert modell (midten) og 4XT1-basert modell (nederst).

Figur 20 Illustrasjon av fremtidige studier. Viser det som har blitt gjort i denne studien og hva som må gjøres i fremtidige studier.

Tabelliste

- Tabell 1** Aminosyres klassifisering som hydrofob eller hydrofil.
- Tabell 2** Oversikt over tre valgte templater som ble brukt til molekylmodellering.
- Tabell 3** Ramachandran Plot statistikk fra PROCHECK.
- Tabell 4** Aminosyrer som former bindingssete i 4YAY-, 4ZUD- og 4XT1-basert modell.
- Tabell 5** Forslag til GPER agonister valgt ut fra virtuell ligand screening.

Forkortelsesliste

2D	To-dimensjonal
3D	Tre-dimensjonal
7TM	Syv transmembran
7TMH	Syv transmembrane α -helikser
ADMET	Absorpsjon, distribusjon, metabolisme, ekskresjon og toksisitet
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
DHEA	Dehydroepiandrosteron
E1	Østron
E2	17 β -Østradiol
E3	Østriol
E _{angel}	Vinkel energi
E _{bond}	Bindingsenergi
ECL	Ekstracellulær loop
E _{elec}	Elektrostatisk energi
EGFR	Epidermal vekstfaktorreseptor
ER	Østrogenreseptor
E _{tors}	Torsjonsenergi
E _{vdw}	Van der Waals energi
FN	Falsk negativ
FP	Falsk positiv
FSH	Folikkelstimulerende hormon
GPCR	G-protein koblet reseptor

GPER	G-protein koblet østrogenreseptor
GPR30	G-protein koblet reseptor 30
HA	Heavy atom
HBA	Hydrogenbinding akseptor
HBD	Hydrogenbinding donor
HB-EGF	Heparinbindende Epidermal Vekstfaktor
ICL	Intracellulær loop
ICM	Internal Coordinates Mechanics
IUPHAR	International Union of Basic and Clinical Pharmacology
LBVLS	Ligand basert virtuell ligand screening
LH	Luteiniserende hormon
MAPK	Mitogenaktiverede proteinkinaser
MM	Molekylmekanisk metode
MMP	Matriks-metalloproteinaser
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear magnetic resonance
PDB	Protein Data Bank
PDB ID	Protein Data Bank kode
PKA	Protein Kinase A
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
Pro-HB-EGF	Pro-heparinbindende epidermal vekstfaktor
PSA	Polar overflateareal
QM	Kvantemekanisk metode
QSAR	Quantitativ structure activity relationship

RMSD	Root-mean-square deviation
RB	Roterbare bindinger
ROC	Receiver Operating Characteristic
SAVES	Structural analysis and verification server
SBDD	Strukturbasert drug design
SBVLS	Strukturbasert virtuell ligand screening
SMILES	Simplified molecular-input line-entry system
SN	Sann negativ
SP	Sann positiv
TF	Transkripsjonsfaktor
TM	Transmembran
TMH	Transmembrane α -helikser
UniProtKB	UniProt Knowledgebase
VLS	Virtuell ligand screening
VS	Virtuell Screening
WDI	World Drug Index
Å	Ångström

1 Introduksjon

1.1 Endokrinologi

Endokrinologi er læren om hormonsystemet. Kommunikasjonen mellom kroppens celler skjer i hovedsak ved hjelp av to systemer; 1) Det endokrine systemet og 2) Nervesystemet. Det endokrine systemet kommuniserer ved hjelp av kjemiske budbringere (hormoner). Organer i det endokrine systemet er kjertler. De viktigste endokrine kjertlene hos mennesker er hypothalamus, hypofysen, skjoldbruskkjertelen, bukspyttkjertelen, binyrene, biskjoldbruskkjertelen, gonadene (testikler og eggstokker) og placenta. Hormoner er signalmolekyler som produseres av endokrine kjertler. Hormoner fraktes via blodet til vev eller organer, der de bindes til spesifikke reseptorer. Når hormoner bindes til reseptorer, utløses det forskjellige reaksjoner i vevet. Hormoner påvirker mange forskjellige prosesser i kroppen, som for eksempel regulering av væske- og elektrolyttbalansen, regulering av vekst og utvikling, lagring og bruk av næringsstoffer (metabolisme), fordøyelsesprosesser og reproduksjon (1).

Hormoner har forskjellige strukturer og kan deles inn i tre klasser (1):

- Peptid- og peptidhormoner (proteiner, glykoproteiner og polypeptider): Det er den største hormongruppen. Peptidhormoner produseres i hypothalamus, hypofysen, bukspyttkjertlene, tarmen og biskjoldbruskkjertlene. Disse hormonene er vannløselige, og kan derfor ikke diffundere gjennom cellemembranen. De må bindes til reseptorer i cellemembranen for å kunne utøve sin virkning på målcellene. Eksempler på slike hormoner er insulin, veksthormoner og antidiuretisk hormon.
- Steroidhormoner: Slike hormoner produseres i binyrebarken, huden, kjønnskjertlene og placenta. Disse hormonene er fettløselige og bindes hovedsakelig til intracellulære reseptorer. Eksempler på slike hormoner er østrogen, testosteron og aldosteron.
- Aminosyrederivater og fettsyreforbindelser: Disse produseres i skjoldbruskkjertelen og i binyremargen. Fettsyreforbindelsene er fettløselige og bindes hovedsakelig til intracellulære reseptorer. Aminosyrederivater er både vannløselige (katekolaminene) og fettløselige (tyreoideahormonene) hormoner. Eksempler på slike hormoner er adrenalin og tyroksin.

1.1.1 Steroidhormoner

Steroidhormoner er den nest største hormongruppen. Disse hormonene spiller en viktig rolle i regulering av normal fysiologi og behandling av sykdommer. Steroider er lipofile molekyler som anvendes som kjemiske budbringere. Siden disse hormonene er fettløselige må de transporteres ved å binde til vannløselige transportere. I blodet er 90-99,7 % av steroidhormoner, vitamin D₃ metabolittene og tyreoideahormoner bundet til transportproteiner (2). Steroidhormoner syntetiseres og utskilles i hovedsak av eggstokkene, testiklene og binyrene. I tillegg omdannes steroider av andre organer og vev som fettvev, placenta, hjerne, hud og lever. Kjemiske strukturen til disse hormonene ligner på hverandre og de har en del felles biologiske egenskaper, selv om de kommer fra forskjellige organer. Steroidhormoner har fem hovedgrupper: 1) Progestagener som progesteron med 21 karbonatomer, 2) Glukokortikoider som kortisol med 21 karbonatomer, 3) Mineralkortikoider som aldosteron med 21 karbonatomer, 4) Androgener som testosteron med 19 karbonatomer og 5) Østrogener som østradiol med 18 karbonatomer (3). Den aktive metabolitten av vitamin D₃, Kalsitriol, regnes også som steroidhormon og dannes i nyrene.

Basert på avstanden til målområde blir steroidhormoner klassifisert som enten endokrin, parakrin eller autokrin. Endokrin er når cellen ikke er målcellen og hormoner må fraktes via blodbanen. Parakrin er når signalet virker på nærliggende celler. Dette signalet virker over korte avstander og brytes ned av ekstracellulære enzymer. Autokrin er når cellen er målcellen og da blir signalet sendt innad i cellen (4).

Kolesterol er forløperen til de fem hoved steroidhormonene. Uten kolesterol vil hele steroidhormon-anabolismen bryte ned med fatale konsekvenser for metabolsk homøostase og reproduksjon. I tillegg er kolesterol viktig for stabilitet av cellemembranen. Kolesterol er tilstede i plasmamembran og der blir kolesterol ført til mitokondriene ved hjelp av proteiner. I mitokondriene skjer det første trinnet av steroidhormonsyntesen, der kolesterol blir omdannet til pregnenolon (3). Spalting av sidekjeden fra kolesterol for å gi pregnenolon er involvert i syntesen av alle steroidhormoner (4).

Når steroider bindes til reseptorer aktiveres det en rekke cellulære reaksjoner. Disse reaksjonene er ofte delt inn i to kategorier (5):

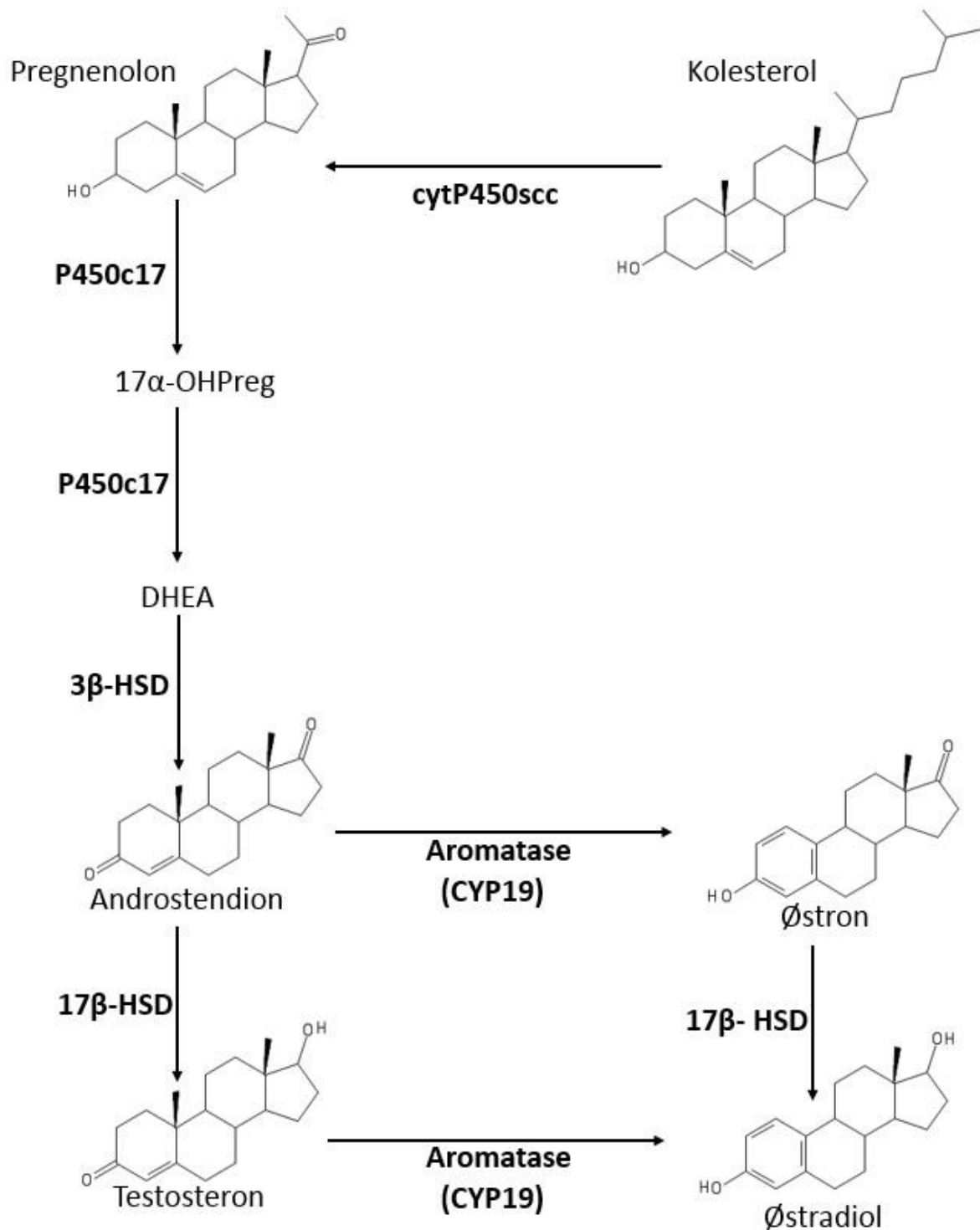
- 1) Genome effekter: Disse effektene er preget av forandringer i gen-transkripsjon og forekommer på en periode fra timer til dager. Denne kategorien er ofte forbundet med ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer som klassiske steroid-reseptorer.
- 2) Non-genome effekter: Disse effektene oppstår i løpet av sekunder til minutter. Denne kategorien er ofte forbundet med vekstfaktorreseptor og G-protein koblede reseptorer (GPCR), der den påvirker cellulære responser som kalsium-mobilisering og kinase aktivering.

1.2 Østrogen

Østrogener er en av de primære kvinnelige kjønnshormoner. Den har en viktig rolle både i reproduktive- og ikke-reproduktive systemer. Det finnes tre naturlig forekommende østrogener. Det første østrogenet er østron (E1), som produseres i binyrebarken og fettvev. Dette hormonet er viktig etter menopause. Det andre østrogenet er 17 β -Østradiol (E2), som produseres i eggstokker. E2 er kroppens viktigste østrogen, spesielt viktig i premenopause periode. Det siste østrogenet er østriol (E3), som er den minst potente østrogenet. E3 produseres i placenta og er et viktig hormon under svangerskapet. Disse tre naturlig forekommende østrogener er C18 steroider og som nevnt over avledes de av kolesterol (6-8).

Hos kvinner ligger plasmakonsentrasjonen av østrogen vanligvis på ca. 1nM. Gjennom menstruasjonssyklusen varierer konsentrasjonen av østrogen i kroppen. Østrogennivået når sin topp i egglossningsfasen og avtar etter egglossningen. Konsentrasjonen i normalt brystvev av postmenopausal kvinner har blitt rapportert til å være 10-20 ganger høyere enn serumkonsentrasjonen, noe som kan tyde på lokal produksjon eller høy lokalt konsentrasjon av hormonet i brystvev (5).

Biosyntese av østrogener skjer ved aromatisering i eggstokkene. Aromatisering er en enzymatisk reaksjon som skjer ved hjelp av enzymet aromatase. Aromatase er et cytokrom P450 enzym som finnes i forskjellige vev, og som har ansvaret for å omdanne androstendion og testosteron til østron og 17 β -Østradiol (Figur 1) (9).



Figur 1 Østrogensyntesen i eggstokkene. Kolesterol omdannes til pregnenolon, katalysert av cytokrom P450 sidekjedespaltings enzym (cytP450scc). Cytokrom 17 α -hydroksylase (P450c17) katalyserer omdannelsen av pregnenolon til 17 α -hydroksypregnenolon (17 α -OHPreg) og deretter til dehydroepiandrosteron (DHEA). 3 β -Hydroksysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) konverterer DHEA til androstendion. Deretter blir androstendion omdannet til testosteron ved 17 β -hydroksysteroid-dehydrogenase (17 β -HSD). Human aromatase gen CYP19 omdanner østron fra androstendion og østradiol fra testosteron. Østron kan også blir omdannet til østradiol ved 17 β -HSD.

Produksjonen av østrogen reguleres av follikkelstimulerende hormon (FSH) og luteiniserende hormon (LH). Disse hormonene utskilles fra hypofysen. Funksjonen til LH er å stimulere opptaket av kolesterol og omdannelsen til androstendion i cellene. Aktiviteten aromatasen har, stimuleres av FSH og LH. Dette fører til reduksjon i produksjon av østrogen. Ved manglende follikkeldannelse vil produksjon av FSH og LH øke fra hypofysen. Med alderen vil østrogennivået minke i kroppen og dette kan føre til svettetokter, økt risiko for hjerte- og karsykdommer, beinskjørhet, slimhinner kan bli tynnere og brystene kan bli mindre.

Hos kvinner i fertil alder produseres østrogen primært i eggstokkene og i placenta hos gravide kvinner. Etter overgangsalderes slutter eggstokkene å produsere østrogen, og i stedet skjer aromatiseringsreaksjonen i binyrene, leveren, huden, muskelvev, beinvev og fettvev (5-8).

Medikamentell behandling med østrogen blir brukt til primær eggstokksvikt (turners syndrom), sekundær eggstokksvikt (menopause), prostatakreft, brystkreft og som prevensjonsmiddel. Antiøstrogen medikamenter blir brukt til å blokkere virkningene av østrogen. Klomifen, tamoksifen, fulvestrand og raloksifen er eksempler på antiøstrogen. Klomifen blir brukt for å indusere eggøsning i behandling av infertilitet. Tamoksifen blir brukt til behandling av østrogen-sensitive brystkreft. Fulvestrand blir brukt til behandling av østrogenreseptorpositiv brystkreft hos postmenopausale kvinner og raloksifen blir brukt til behandling og forebygging av osteoporose hos postmenopausale kvinner (10).

1.3 Farmakodynamikk

Farmakodynamikk beskriver hvordan ligander (legemidler) interagerer med målmolekyler og utløser forskjellige effekter (ønsket/uønsket) i kroppen vår. Ligander er molekyler som binder seg til reseptorer. Farmakodynamikk beskriver både biokjemiske effekter i celler og fysiologiske effekter i vev og organer. Det er flere faktorer som påvirker farmakodynamikken i kroppen, som for eksempel genetiske forhold, alder, kjønn, mat og drikke, andre legemidler, naturmidler og toleransen.

1.3.1 Målmolekyler

Målmolekyler er molekyler som legemidler bindes til og gir effekt. Legemiddel-målmolekyl interaksjon anses til å være en dynamisk prosess. Binding av et legemiddel til målmolekyl er svært struktur og stereospesifikk. Når et legemiddel bindes til målmolekyl, utøves det en effekt. Legemidler virker på ulike type målmolekyler. De fire hovedtypene er reseptorer, transportmolekyler, ionekanaler og enzymer. Alle disse er membranproteiner, men det finnes også målmolekyler som ikke er membranproteiner, som for eksempel nukleinsyrene (DNA og RNA) og lipider (11).

De viktigste målmolekylene er reseptorer. Når et ligand bindes til en reseptor forandres formen og funksjonen av reseptormolekylet og utløser en effekt. Ligander som bindes til reseptorer kan klassifiseres som agonist (utløser en effekt), antagonist (hemmer en effekt) eller partielle agonister, som kun utløser en partiell effekt. Eksempler på legemidler som virker via reseptorer er opioider (morfin), antihistaminer og steroidhormoner (11).

Reseptorer er delt inn i fire forskjellige grupper:

- Ionekanal-reseptorer (f.eks. Neurotransmitter reseptorer)
- Enzymkoblede reseptorer (f.eks. Insulinreseptorer)
- G-protein koblede reseptorer (f.eks. G-protein koblet østrogenreseptor)
- Intracellulære reseptorer (f.eks. Steroidreseptorer)

Transportmolekyler er proteiner som transporterer molekyler og ioner over cellemembraner, blant annet ioner som Na^+ og Ca^{2+} , aminosyrer og serotonin. Selektive serotoninreopptakshemmere (SSRI), diuretika og digitalis er eksempler på legemidler som virker via transportproteiner (11).

Ionekanaler er proteinkanaler gjennom cellemembraner. Disse kanalene tillater ioner å bevege seg mellom innsiden og utsiden av celler. Ionekanalens åpning kontrolleres av en port som styres av elektriske krefter. Åpning av ionekanalene er styrt av hormoner, ligander, pH, membranpotensial og andre signalfaktorer. Eksempler på legemidler som virker via ionekanaler er antiarytmika og kalsiumantagonister (11).

Enzymer er proteiner som kontrollerer kroppens kjemiske reaksjoner. Legemidler påvirker enzymer ved å enten øke eller reduseres enzymaktivitet. En inhibitor som ligner på substratmolekylet, kan hemme enzymet ved å konkurrere med substratmolekylet om plassen i det aktive setet. Andre måter å hemme enzymet på er at en inhibitor festes et annet sted på enzymet og endrer den romlige enzym strukturen slik at substratmolekylet ikke lenger passer helt inn. Slike reaksjoner er reversible og brukes av statiner. Irreversibel hemming kan også oppstå ved at organiske molekyler binder seg fast til enzymet og blokkerer det aktive setet. Denne type hemming brukes av ACE-hemmere (11).

1.3.2 Legemiddel-reseptor interaksjoner

Legemidler danner kjemiske bindinger med reseptorer. Når det dannes kjemiske bindinger avgis det energi og for å bryte denne bindingen må like mye energi tilføre. Slik energi kalles bindingsenergi. Kjemiske bindinger deles inn i to hovedgrupper; Sterke- og svake bindinger. Intramolekylære krefter virker mellom atomene i molekylene. Disse bindinger er som oftest sterke bindinger. Sterke bindinger deles inn i metallbindinger, ionebindinger og kovalente bindinger.

Legemidler binder til målmolekylet på en av to måter: 1) Reversibel binding og 2) Irreversibel binding. Reversibel binding er den mest vanlige og det er intermolekylære interaksjoner (ikke kovalente bindinger) mellom legemiddel og målmolekyl. Det er da likevekt mellom fritt og bundet legemiddel. Irreversibel binding er dannelse av kovalent binding mellom legemiddel og målmolekyl. Da forblir legemiddelet bundet til målmolekylet. Slike bindinger er mest relevant for legemidler som virker på DNA og enzymer.

Som nevnt over er noen legemidler i stand til å interagere med bindingssetet av reseptoren gjennom kovalente bindinger. Kovalent binding oppstår når to atomer deler elektronpar. Slike bindinger er sterke bindinger og irreversible med en bindingsenergi på over 100 kJ/mol.

Intermolekylære krefter er krefter mellom atomer som ikke er direkte bundet til hverandre. Denne type interaksjon oppstår vanligvis mellom et legemiddel og bindingssetet av dets reseptor. Det er to hovedtyper av intermolekylære interaksjoner; 1) Elektrostatiske interaksjoner og 2) Van der Waals interaksjoner. Elektrostatiske interaksjoner inkluderer ionebindinger, ione-dipol bindinger, dipol-dipol bindinger og hydrogenbindinger. Van der

Waals interaksjoner er svakere elektrostatiske interaksjoner. Disse danner svake bindinger og gir mulighet til å være reversible. Hver av disse typene intermolekylære krefter har sine potensielle strukturkjemiske særtrekk. Felles for slike krefter er at de er svakere enn kovalente bindinger.

Elektrostatiske interaksjoner:

- Ionebinding: Den type binding oppstår mellom ioner på grunn av elektrostatisk interaksjon mellom motsatt ladede grupper som er beskrevet av Coulombs lov. Coulombs lov sier at kreftene mellom to partikler øker med ladningens størrelse og med kortere avstand mellom partiklene. Interaksjonen blir påvirket av vann og er pH avhengig. Denne interaksjonen er svakere enn kovalent binding, men sterkest av intermolekylære interaksjoner. Den har en bindingsenergi på 40-400 kJ/mol.
- Ion-dipol binding: Den type binding er en elektrostatisk interaksjon som oppstår mellom en partiell ladet dipol og en ion i motsatt ladning. Denne type interaksjon har en bindingsenergi på 3-10 kJ/mol.
- Dipol-dipol binding: Den type binding er en svak binding som skyldes tiltrekning mellom den positive delen av et molekyl (dipol) og den negative delen av den andre molekylet. Slike interaksjoner kan ha bindingsenergi på 0,5-3 kJ/mol.
- Hydrogenbinding: Den type binding oppstår mellom elektronegativ atom (F, O, Cl eller N) og et hydrogenatom. Hydrogenbindinger er vinkel avhengig (180°) og kan bli påvirket av vann. Bindingsenergien til hydrogenbindinger kommer sjelden over 60-70 kJ/mol.

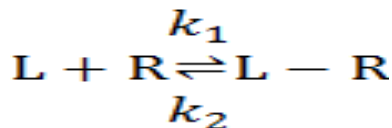
Van der Waals interaksjoner:

Den type binding er drevet av elektrostatiske krefter som oppstår mellom motsatte ladninger. Slike bindinger er avstands avhengig. Hydrofobe interaksjoner og aromatisk stacking interaksjoner er eksempler på Van der Waals interaksjoner. Van der Waals interaksjoner har oftest bindingsenergi på 3-10 kJ/mol.

1.3.3 Affinitet

Affinitet beskriver bindingsstyrken mellom ligander og reseptorer. Ligander med høy affinitet er egnet hvis man ønsker å indusere endringer i reseptoren. Grunnen til dette er at høy affinitets ligander har høy bindingsstyrke og dermed forblir lenger på stedet. Derfor vil for eksempel cellereseptorer med kombinert ionekanaler som aktiveres med binding være mer effektivt bundet av en ligand som har høyt affinitet. Forbindelser som har høy affinitet vil vanligvis binde til reseptorer i høye konsentrasjoner enn en med lavere affinitet.

Forholdet mellom ligand (L) bundet til en reseptor (R) beskrives slik:



L = Fri ligand

R = Fri reseptor

L-R = Ligand-reseptorkompleks

k_1 = Hastighetskonstant for assosiasjon

k_2 = Hastighetskonstant for dissosiasjon

Hvis et ligand binder sterkt til en reseptor, vil likevekten forskyves mot høyre. Vi kan øke effekten av L-R ved å øke L eller R. Bindingsstyrken (affiniteten) mellom et ligand og reseptor beskrives ved hjelp av likevekt dissosiasjonskonstanten K_D og kan beregnes slik:

$$K_D = \frac{k_2}{k_1} = \frac{[L] \cdot [R]}{[L-R]}$$

[L] = Konsentrasjon av fri ligand

[R] = Konsentrasjon av fri reseptor

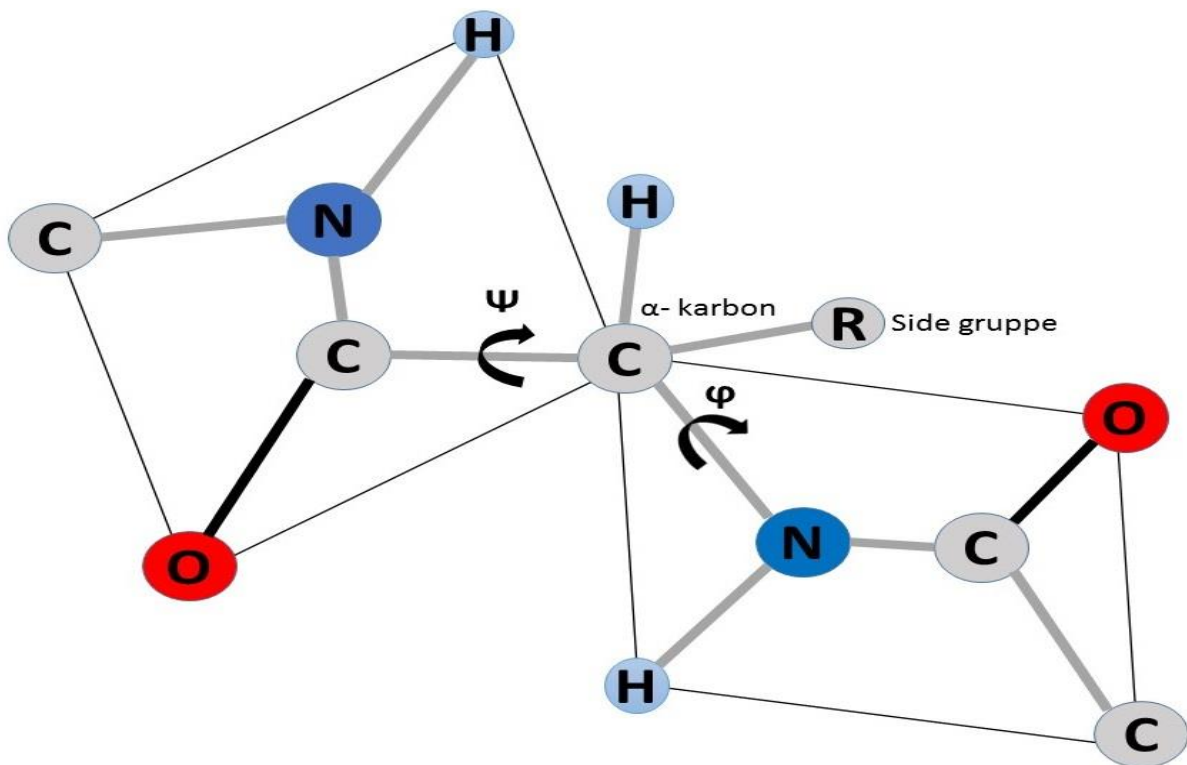
[L-R] = Konsentrasjon av ligand-reseptorkompleks

En ligand med lav K_D binder sterkt til reseptoren, da trengs det lav konsentrasjon av liganden for å okkupere 50% av reseptoren. En ligand med høy K_D binder svakt til reseptoren, og da trengs det høy konsentrasjon av liganden for å okkupere 50% av reseptoren. Jo lavere K_D er, jo sterkere er bindingen og vi ønsker så lav K_D som mulig. Ulike ligander vil ha ulik K_D for samme reseptor. Dissosiasjonskonstanten ligger i nanomolar område.

1.4 Proteiner og protein struktur

Proteiner er store molekyler som befinner seg i alt som lever. Menneskekroppen inneholder rundt en million forskjellige proteiner. Proteiner har forskjellige oppgaver i kroppen vår. De er byggesteiner i kroppen og utfører spesielle oppgaver i og mellom cellene. Alle proteiner er bygd opp av aminosyrer. Det er om lag 20 naturlige aminosyrer, og disse inneholder både karboksylsyregruppe (-COOH), og en aminogruppe (-NH₂) bundet til samme karbonatom (α -karbon). Dette karbonatomet er også bundet til et hydrogenatom og en sidekjede (R) (Figur 2). Denne sidekjeden gir aminosyrer individuelle egenskaper. Aminosyrene kan gå sammen og danne polypeptidkjeder eller proteiner på forskjellige måter. Hver protein har en egen rekkefølge av aminosyrer og denne rekkefølgen gir egenskaper til proteinet. Slike egenskaper kan bestemme hvordan proteinet skal fungere i kroppen og hvilke egenskaper den skal ha. Kjeder som inneholder færre enn 50 aminosyrer kalles ikke proteiner, men peptider (12).

Hovedkjeder består av sekvensen av tre atomer, amid N, α -karbon og karbonyl C. Aminosyre sidekjeden er lokalisert på chiral α -karbon (Figur 2). α - karbon gir to stereoisomere der de skiller seg ved at de er speilbilde av hverandre. Dermed kan vi si at alle naturlige aminosyrer som blir funnet i protein er enantiomere (12). Enantiomer gir D- og L-form av aminosyrer, men i naturen finnes det nesten kun aminosyrer i L-form.



Figur 2 Aminosyrer i en polypeptidkjede med hovedkjede vinklene Ψ og Φ .

Geometrien av hovedkjeder av et protein er karakterisert ved hovedkjede vinklene Ψ , Φ og ω (Figur 2). Peptid binding (ω), mellom amid N og karbonyl er i ett plan. Rotasjon mellom N-C ^{α} og C-C ^{α} enkelbinding i peptidkjeden er begrenset på grunn av sterisk hindring mellom sidekjedene (12).

Aminosyrer er klassifisert som enten hydrofob (Ikke-polar) eller hydrofil (polar) og former hydrogenbinding (bortsett fra Prolin) (Tabell 1).

Tabell 1 Aminosyres klassifisering som hydrofob eller hydrofil.

Hydrofob		Alanin (Ala), cystein (Cys), glysin (Gly), isoleucin (Ile), leucin (Leu), methionin (Met), phenylalanin (Phe), tryptofan (Trp) og valin (Val).
	Nøytral	Asparagin (Asn), glutamin (Gln), prolin (Pro), serin (Ser), treonin (Thr) og tyrosin (Tyr).
Hydrofil	Sur	Aspartat (Asp) og glutamat (Glu).
	Basisk	Arginin (Arg), histidin (His) og lysin (Lys).

Proteiner har fire strukturelle nivåer, primær, sekundær, tertiær og kvartærstruktur (12):

- Primærstruktur: Angir aminosyresekkefølgen i proteinet og beskriver kovalente bindinger i en polypeptidkjede. Primærstruktur inkluderer også eventuelle disulfidbindinger og aminosyreendringer i proteinet.
- Sekundærstruktur: Skapes ved at proteiner folder seg. Dette blir til ved hydrogenbindinger mellom atomer. Disse hydrogenbindingene bidrar til stabilitet av strukturen. Vi har to hovedtyper av sekundærstrukturer: 1) Alfa-helikser (α -helikser), som ser ut som en spiral og 2) Beta-flaker (β -sheets), som har flate former. Sekundærstruktur kan beskrives av vinklene Ψ og Φ . Ramachandran plot viser den sekundærstruktur presentasjonen av vinklene Ψ og Φ som er tillatt. Sekundærstrukturen til transmembrane helikser i membran proteiner er α -helikser.

- Tertiærstruktur: Er 3D strukturen av polypeptidkjeder. Proteinets biologiske funksjoner avgjøres av tertiærstrukturen. Hovedtyper av tertiærstrukturer er globulære proteiner (kuleformede) og fiberproteiner. Kuleproteiner er kompakte og runde molekyler. Disse er vannløselige eller løselig i svake saltoppløsninger. Fiberproteiner er fibre som er uoppløselig i vann, men kan løses i sterke syrer og baser.
- Kvantærstruktur: Er når flere peptidkjeder er bundet sammen i proteiner som inneholder mer enn en polypeptidkjede. Disse er bundet sammen med svake bindinger.

1.5 G-protein koblede reseptorer

G-protein koblede reseptorer (GPCR) er en gruppe av membran-bundede reseptorer som utøver sin effekt ved å overføre signaler via intracellulære G-proteiner. Disse reseptorer er viktige reseptorer for mange sykdommer. Omtrent 80 % av hormoner og signalstoffer aktiverer cellulære signaloverføringsmekanismer ved å aktivere GPCR, og ca. 30-45 % av dagens legemidler vi har på markedet er rettet mot GPCR. GPCR har en felles syv-transmembran (7TM) α -helikser som har ansvaret for mange ekstravaskulære signaler, alt fra fotoner og små molekyler til peptider og proteiner. GPCR er uttrykt i nesten alle vev og disse har ansvaret for mange fysiologiske prosesser i kroppen vår, som sansene (syn, lukt og smak), nevrologi, kardiovaskulære, endokrine og reproduktive funksjoner. Det menneskelige genomet koder for ca. 800 GPCR som er delt inn i klasser basert på deres aminosyresekvens. De er delt inn i fire hovedklasser eller fem familier: A (Rhodopsin), B (Adhesion og Secretin), C (Glutamate) og F (Frizzled) (13, 14). Klasse B, C og F er liten reseptorklasse, mens klasse A er den største og inneholder mange reseptorer. Det finnes også to andre klasser som D og E, men disse representerer sopp feromon-reseptorer og cAMP reseptorer (15).

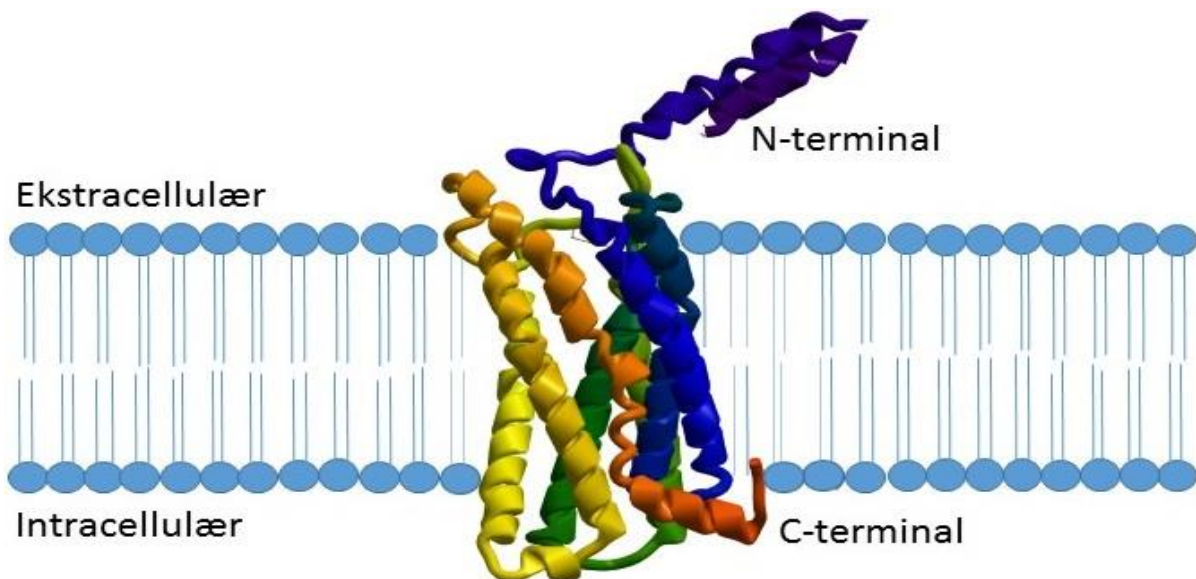
GPCR er transmembrane reseptorer som utøver de fleste av sine intracellulære handlinger gjennom aktivering av G-proteiner. G-proteiner sender signaler til effektor proteiner, enzymer og ionekanaler, som resulterer i raske endringer i konsentrasjoner av intracellulære signalmolekyler, cAMP, cGMP, inositolfosfater, diacylglycerol, arakindonsyre, og cytosoliske ioner. G-protein aktivering har også blitt implisert i signaltransduksjon mediert av flere tyrosinkinase-reseptorer. Dysfunksjon i GPCR kan forårsake sykdommer hos mennesker (16).

Alle GPCR har 7-transmembrane α -helikser (7TMH) med tre intracellulære looper (ICL1, ICL2 og ICL3), tre ekstracellulære looper (ECL1, ECL2 og ECL3), en ekstracellulær N-terminal og en intracellulær C-terminal (13).

Reseptorer som aktiverer G-proteiner trenger ikke å være GPCR. Det stilles to krav til at en reseptor skal bli klassifisert som en GPCR. Det første kravet er relatert til syv sekvens strekninger på omtrent 25-35, som viser en relativt høy grad av hydrofobitet. Disse sekvenser antas å representere syv α -helikser som strekker seg over plasmamembranen i en venstreroterende retning og danner en reseptor som gjør det mulig for en ekstracellulær ligand å utøve sin effekt i cellen. Det andre kravet er at reseptoren skal være i stand til å interagere med et G-protein. Det finnes mange funksjonelle koblinger av GPCR; de har en rekke alternative signalveier som interagerer direkte med en rekke andre proteiner (15).

1.5.1 Klasse A GPCR

Klasse A eller Rhodopsin familien er den klassen som har flest GPCR medlemmer. Rhodopsin var den første som fikk sin struktur bestemt av røntgenkrystallografi (13). Klasse A GPCR har en ekstracellulært N-terminal, en intracellulært C-terminal og 7 transmembrane α -helikser (TMH) sammenkoplest av looper (ECL og ICL) (Figur 3) (16). Ligander for de fleste Rhodopsin reseptorer bindes inne i et hulrom mellom TM regionene (15). De fleste av klasse A GPCR har disulfidbinding mellom ECL2 og den øverste delen av TM3.

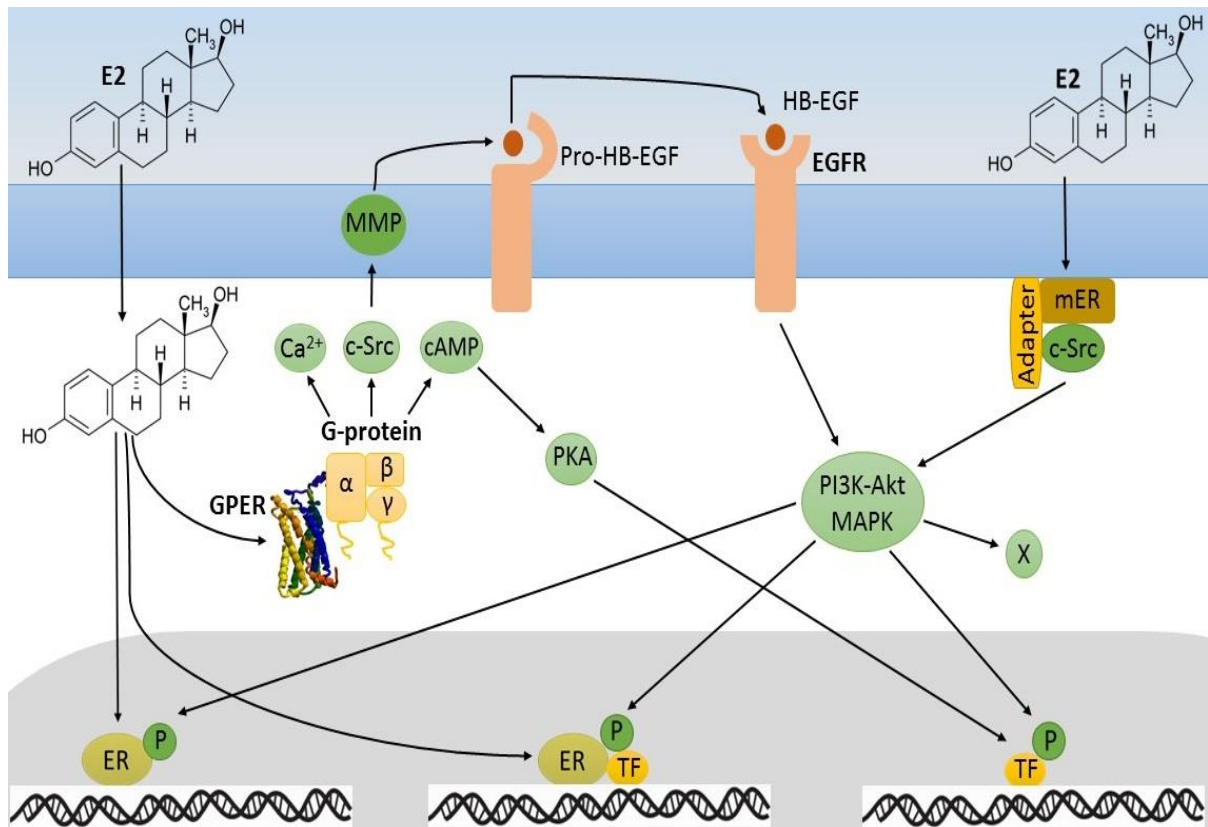


Figur 3 Klassisk modell av Klasse A/ Rhodopsin GPCR i cellemembranen.

1.6 G-protein koblet østrogenreseptor

G-protein koblet østrogenreseptor (GPER), som også er kjent som G-protein koblet reseptor 30 (GPR30), er reseptorer som antas å gi både genome og non-genome effekter av østradiol på celler (5, 17). GPER er en 7TM GPCR som er en viktig reseptor når det gjelder å formidle aktivering av østrogen i immunsystemet, nervesystemet, nyrer, karsystemet og det reproduktive systemet.

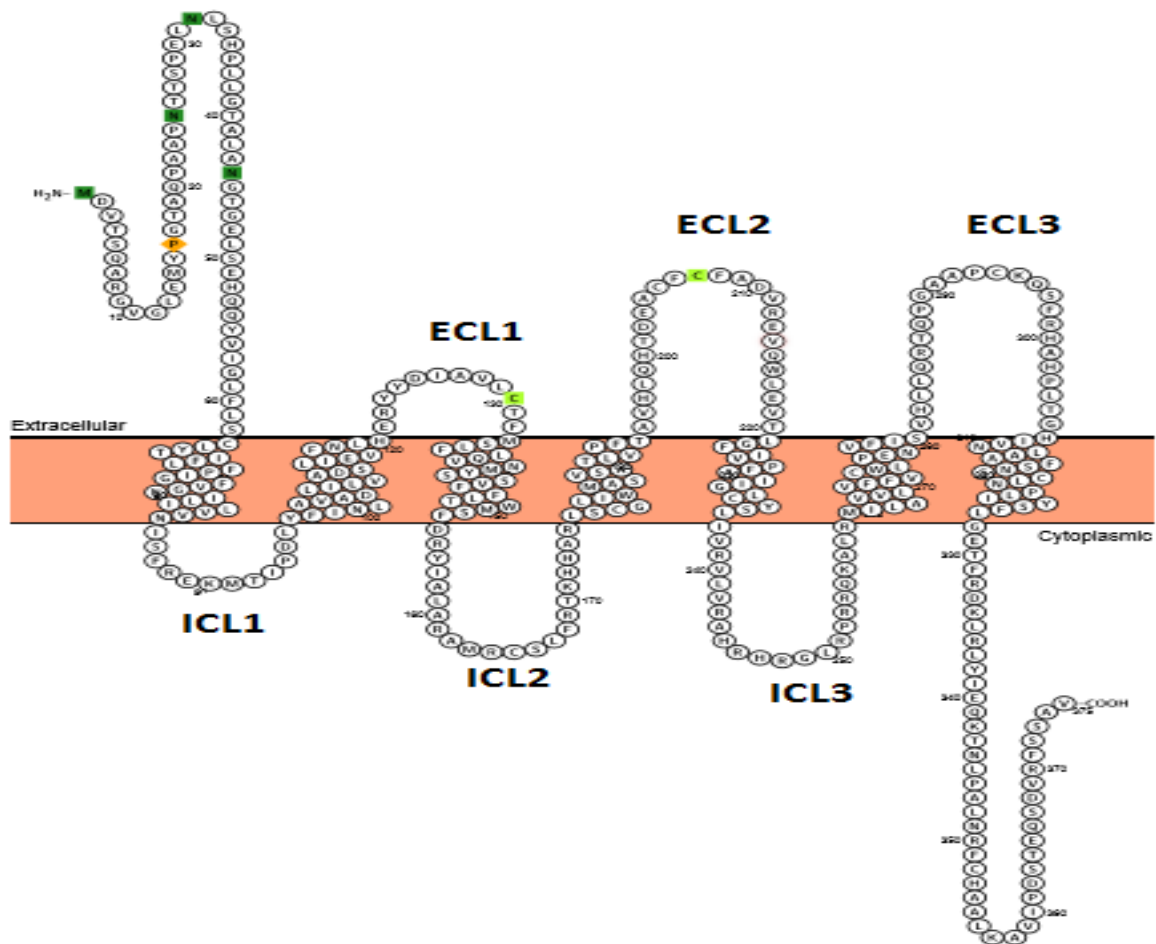
Signalisering gjennom GPER skjer via G-proteiner som stimulerer cyclic adenosine monophosphate (cAMP), kalsium-mobilisering (Ca^{2+}) og c-Src. Stimulering av c-Src fører til aktivering av matriks-metalloproteinaser (MMP), som transaktiverer epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). EGFR aktivering fører til flere cellulære kinaseveier, inkludert aktivering av mitogenaktiverte proteinkinaser (MAPK) og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K-Akt) veier. Aktivering av disse kinaseveiene induserer den raske (non-genome) effekten, eller genome effekten av østrogen. Aktivering av MAPK og PI3K resulterer i fosforylering av klassiske østrogenreseptorer (ER) eller andre transkripsjonsfaktorer (TF) som kan interagere direkte med ER, eller uavhengig av ER innenfor target gener (Figur 4) (5, 17, 18).



Figur 4 Non-genome og genome østrogen signaliseringsveier. G-proteiner stimulerer cyclic adenosine monophosphate (cAMP), kalsium-mobilisering (Ca²⁺) og c-Src. C-Src aktiverer matriks-metalloproteinaser (MMP). MMP spalter pro-heparinbindende epidermal vekstfaktor (pro-HB-EGf). Dette frigjør HB-EGF som transaktiverer epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR). EGFR aktivering fører til aktivering av mitogenaktiverede proteinkinaser (MAPK) og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K-Akt) veier. Denne aktiveringer induserer den raske (Non-genome) effekter (X), eller genome effekter. Aktivering av MAPK og PI3K resulterer i fosforylering (P) av ER eller andre transkripsjonsfaktor (TF). Noen av ER i plasmamembranen som er aktivert av østradiol kan også interagere med adapterproteiner (adapter) og signalmolekylet som c-Src og gi den raske signaliseringen via PI3K-Akt og MAPK.

1.6.1 GPER Struktur

GPER er satt sammen av 375 aminosyrer og tilhører GPCR klasse A (Figur 3). GPER består av 7TM α -helikser. De 7TM α -heliksene er koblet sammen av tre intracellulære looper (ICL1, ICL2 og ICL3), tre ekstracellulære looper (ECL1, ECL2 og ECL3), en ekstracellulær N-terminal og en intracellulær C-terminal (Figur 5). Den ekstracellulære regionen av GPER er ansvarlig for ligand binding, mens den intracellulære regionen er involvert i G-proteinbinding.



Figur 5 Aminosyrebasert diagram av G-protein koblet østrogenreseptor. Generert fra PROTTTER (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>) ved å bruke UniProt ID Q99527.

1.7 Molekylmodellering

Molekylmodellering er en metode som brukes for å analysere tredimensjonal struktur (3D) av biologiske makromolekyler ved hjelp av beregningskjemi og grafiske visualiseringsteknikker. Modelleringsmetoder er en nødvendig prosess selv når røntgenkrystallografi eller NMR strukturen til reseptoren er tilgjengelig. Antall mulige ligand-reseptor-kombinasjoner er ekstremt høy. Å teste alle disse kombinasjonene eksperimentelt vil ikke være praktisk. Molekylmodellering kan være basert på en proteinhomolog med en kjent 3D struktur som i denne studien, eller basert på strukturelle analyser av lavopløsnings strukturer og seterettete mutagenese studier. Molekylmodellering består av to hovedmetoder, kvantemekaniske (QM) og molekylmekaniske (MM) metoder.

QM metode går ut på at man beregner molekylegenskaper basert på Schrödinger-ligningen. Ligningen tar i betraktning interaksjoner mellom elektroner i molekylet. Denne metoden brukes hovedsakelig på mindre molekyler, fordi den har svært omfattende beregninger, er ressurs krevende med lang beregningstid og mange prosessorer. Med andre ord er denne metoden ikke egnet til molekyler som proteiner, DNA og lipid membraner. QM er egnet til beregning av dannelsesentalpi, molekylære orbitalenergier og koeffisienter, partielle atomladninger, elektrostatiske potensialer og dipolmomenter, overgangstilstander og bryting av kovalente bindinger (19).

MM metode er en raskt metode som går ut på at man beregner molekyl-konformasjonsgeometri og energi ved å bruke en kombinasjon av empirisk kraftfelt. Denne metoden er basert på Newtons mekanikk. MM metoden kan brukes på store molekyler, fordi denne metoden har mindre omfattende beregninger enn QM. Molekylmekanikk metoden er egnet for energiminimalisering, identifisering av stabile konformasjoner, energiberegning for spesifikke konformasjoner, generering av ulike konformasjoner og studier av molekylære bevegelser (19). Ved hjelp av ligningen under kan vi beregne den totale steriske energien (E_{MM}) av et molekyl når vi kjenner til bindingslengden (E_{bond}), vinklene (E_{angle}), torsjon (E_{tors}), Van der Waals (E_{vdw}) og elektrostatiske term (E_{elec}) av intramolekylær energier (20).

$$E_{MM} = (E_{bond}) + (E_{angle}) + (E_{torsion}) + (E_{vdw}) + (E_{elec})$$

1.8 Homologimodellering

En todimensjonal (2D) struktur kan være tilstrekkelig til å kunne forutsi den fysikalske og kjemiske egenskapen til et molekyl, men hvis vi skal se på de biologiske egenskapene er vi avhengig av 3D strukturen. Kjennskap til 3D strukturen til et protein kan hjelpe oss å utvikle nye behandlingsformer for sykdommer.

Metoder som kan anvendes for å bestemme 3D strukturen eksperimentelt er røntgenkrystallografi og NMR spektroskopi. Disse metodene er veldig arbeids- og tidskrevende samtidig som det er vanskelig å krystallisere membranproteiner.

Membranproteiner er spesielt vanskelig å krystallisere. Hvis vi fjerner membranen vil strukturen ikke lenger være stabil, dette er fordi membraner stabiliserer strukturen.

Å bestemme strukturen av et protein er en lang og omstendelig prosess, og det foregår over mange trinn.

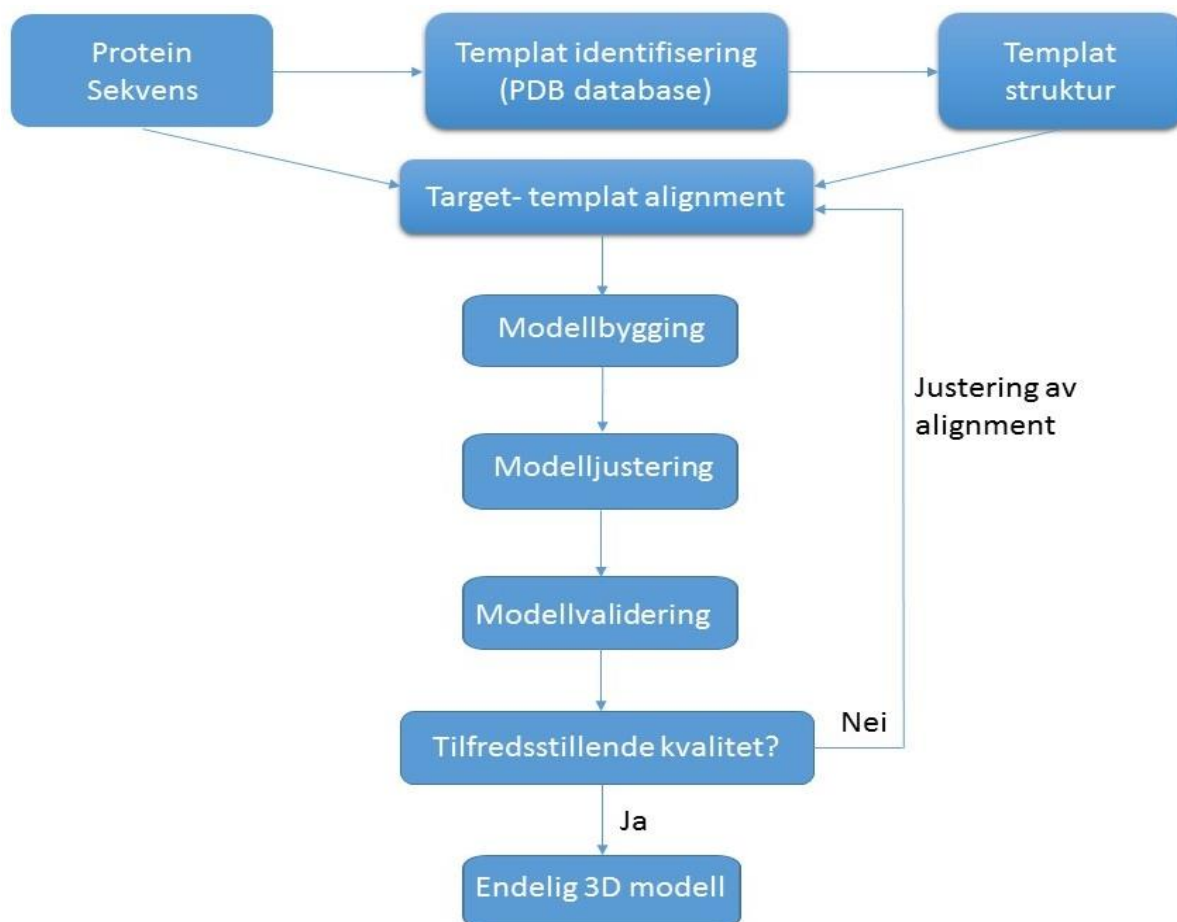
En annen metode som kan anvendes i stedet for røntgenkristallografi og NMR spektroskopi er homologimodellering. Homologimodellering er en *in silico* (datamodellering) metode som brukes til å forutsi 3D strukturen av et protein fra dets aminosyresekvens. Selv om homologimodellerings metoden er mindre pålitelig enn eksperimentelle metoder, er denne metoden godt egnet når man ikke har god tid. Denne metoden tar ikke så lang tid sammenlignet med eksperimentelle metoder. Modellen er ofte tilstrekkelig for bruk i strukturbasert legemiddel design (SBDD), og derfor har homologimodellering blitt en del av SBDD (21).

Det er generelt antatt at proteiner med lignende aminosyresekvenser vil ha liknende 3D struktur. 3D strukturen til et protein (ukjent struktur) kan bli foreslått fra eksperimentelle (røntgenkristallografi / NMR) 3D strukturer av lignende (homologt) proteiner. Disse 3D strukturene vil bli brukt som templat. Templater må ha en sekvenslikhet med target. Sekvenslikhet indikerer at de to proteiner har en lignende funksjon og felles stamfar (22).

Homologimodellering består av flere trinn, de fem hovedtrinnene er:

- Templat identifisering
- Target-templat alignment
- Modellbygging
- Modelljustering
- Modellvalidering

Når disse stegene er ferdig, vurderer man om modellen har tilfredsstillende kvalitet. Hvis modellen ikke har en tilfredsstillende kvalitet går vi tilbake og retter feilen. Hvis modellen har en tilfredsstillende kvalitet, har vi fått en endelig 3D modell av proteinet ved hjelp av homologimodellerings metoden (Figur 6) (21, 22).



Figur 6 Trinnene i homologimodellering.

1.8.1 Templat identifisering

Et templat er et molekyl som fungerer som et mønster for å bygge et annet molekyl. Første trinnet i homologimodellering er å finne den best egnede krystallstrukturen som kan brukes som templat. I dette trinnet blir aminosyresekvensen av ukjent struktur sammenlignet med kjent struktur løst ved hjelp av røntgenkrystallografi eller NMR studier. Kjente 3D strukturer er samlet i en database kalt protein data bank (PDB). Ved å bruke BLAST søk av target sekvensen kan vi finne den best egnede templatet. Når et templat og target har en sekvenslikhet kan vi også forvente en 3D strukturellikhet mellom disse. Ved valg av templat er det viktig å tenke på om det skal bindes til en agonist eller antagonist. Den best egnede templatet er den som er i egnet konformasjonsstilstand og har høyest sekvenshomologi til target. Det er samtidig viktig å velge et templat med høy krystallografisk oppløselighet (Å). Høy oppløselighetsverdi indikerer at det er detaljert strukturinformasjon, som kan bidra til å gi oss en bedre 3D modell. Generelt er en krystallstruktur med høy homologi til target reseptor og høy oppløselighet den best egnede templatet (21-24).

1.8.2 Target-templat alignment

Et target er en betegnelse på et mål, og i denne studien er target GPER. Andre trinnet i homologimodellering er target-templat alignment. Når det best egnede templatet er valgt, er nøyaktig alignment av target sekvensen til templat strukturen avgjørende for den endelige modellkvaliteten. Hensikten med target-templat alignment er å gjenskape den likheten så nøyaktig som mulig. Man kan finne områder som kan være betydelige strukturelle forskjeller mellom target og templatet. Disse strukturelle forskjeller er som oftest resultat av innsetting, fjerning, eller store endringer i aminosyresekvensen. Target-templat alignment kan deles inn i tre deloppgaver; 1) Å generere innledende sekvens-struktur alignment, 2) Finne ut hvilke regioner som trengs justering og 3) Forbedre alignmentet. Jo mer nøyaktig alignmentet er, jo mer nøyaktig blir modellen og mindre justering trengs å gjøres med den endelige modellen (21-24).

1.8.3 Modellbygging

En 3D strukturmodell av target bygges basert på den target-templat alignmentet som blir gjort i trinn to i homologimodellering. Modellbygging består av flere trinn: 1) Kjernermodellering, der transmembrane områder blir modellert, 2) Loop modellering, der intracellulær og ekstracellulære områder blir bygd og 3) Optimalisering av sidekjeder og hovedkjeder. I denne studien ble det brukt ICM homology modeling macro module som involverer alle tre nevnte trinnene i modellbyggingen (24).

1.8.4 Modelljustering

Modelljustering er et viktig trinn i homologimodellering. I dette trinnet elimineres eventuelle feil som har oppstått ved bygging av modellen. Aminosyrer som kommer for nært hverandre må justeres og sterisk hindring må unngås. Først skal den mest usikre delen av modellen justeres. Kvaliteten av modellen er avhengig av justeringer som blir gjort og hvor lavt energien blir. Modellen skal ha så lavt energi som mulig (24).

1.8.5 Modellvalidering

Modellvalidering involverer vurdering av bindingsvinkler, vridningsvinkler og at bindingslengder er innenfor aksepterte områder. Denne valideringen kan bli gjort ved hjelp av online verktøy som for eksempel SAVES (Structural Analysis and Verification Server) og seterettete mutagenese studier (24). Mutagenese studier er studier som foreslår viktige aminosyrer i modeller. Ved hjelp av slik studie kan det kontrolleres om de viktige aminosyrer er tilstede i modellen som ble bygd. Hvis den bygde modellen har tilfredsstillende kvalitet, har man en endelig 3D struktur.

1.9 Dokking og scoring

Dokking er en prosess i molekylmodellering som involverer prediksjon av ligandkonformasjon, orientering i target og bindingssete i target. Det er to formål med dokking: 1) Nøyaktig strukturell modellering som inkluderer posisjon og orientering i bindingssettet og 2) Prediksjon av aktivitet/affinitet. Dokkingsprosessen begynner med å påføre dokkings algoritmer, som plasserer små molekyler i det aktive setet. Algoritmer er komplementert ved scorings-funksjon, som er designet til å forutsi den biologiske aktiviteten gjennom evaluering av interaksjoner mellom forbindelser og potensiell target (25).

Evaluering og rangering av forutsagte ligandkonformasjoner er en viktig del av strukturbasert virtuell screening. I hovedsak finnes det tre klasser av scorings funksjoner: 1) Kraftfelt basert, 2) Empirisk og 3) Kunnskapsbasert scorings funksjon. Kraftfelt basert scoring avledes fra fysikalsk atomisk interaksjon, inkludert Van der Waals interaksjoner, elektrostatiske interaksjoner og bindings-, strekkings-, bøyings- og torsjonskraft. Den empiriske scorings funksjonen avledes fra viktige energibetingelser involvert i ligandbinding, som Van der Waals interaksjoner, elektrostatiske interaksjoner, hydrogenbindinger, entropi og hydrofobitetsenergi. Den kunnskapsbasert scorings funksjonen avledes fra energipotensialer tatt ut fra strukturelle informasjoner samlet fra eksperimentelle studier (25).

Scorings funksjon er basert på bindingsenergien (ΔG) mellom et ligand og target. Dette beregnes ved hjelp av Gibbs-Helmholtz ligning:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_i$$

ΔH = Endring i entalpi

T= Temperatur i kelvin

ΔS = Endring i entropi

R= Gass konstanten

K_i = Bindingskonstant

Det finnes i hovedsak tre forskjellige metoder for dokking. 1) Rigid dokking, der både liganden og reseptoren antas å være rigide, 2) Semi-fleksibel dokking, der kun liganden er fleksibel og reseptoren er rigid, og 3) Fleksibel dokking, der både liganden og reseptoren er fleksible. Disse metodene er alle egnet for en spesiell type dokking. Rigid ligand og rigid reseptor metoden brukes når interaksjonen mellom target og liganden er allerede kjent før dokking. Bruk av fleksibel ligand og fleksibel reseptor er egnet for induert passform mønster, men denne kan ta veldig lang tid. Fleksibel ligand og rigid reseptor er en avveining metode mellom nøyaktighet og beregningsmessig tidsbruk (25).

1.9.1 Receiver operating curves (ROC)

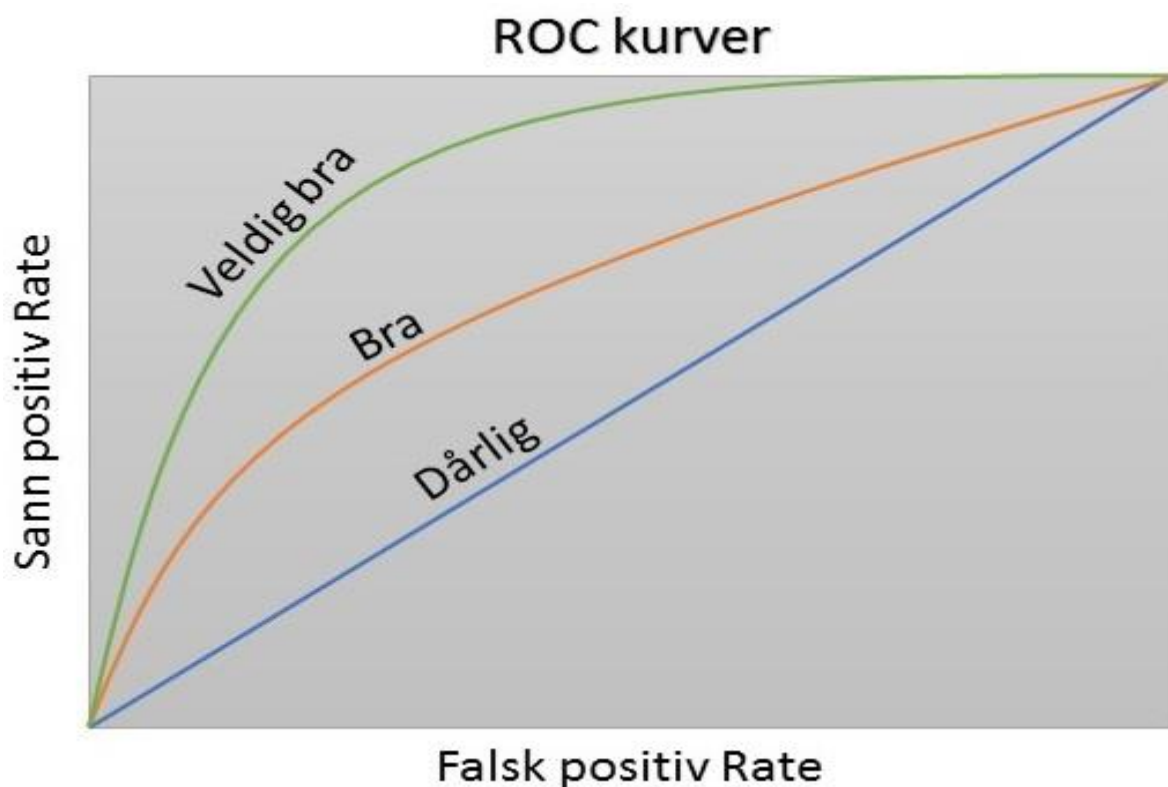
En ROC-kurve er en grafisk illustrasjon som viser avveining mellom sann positiv (SP) fraksjon og falsk positiv (FP) fraksjon. ROC-kurve lages ved å plote SP rate mot FP rate (Se formelen under) (26). SP står for sann positiv (Sann bindingsligander klassifisert som positive), FN står for falsk negativ (Sann bindingsligander klassifisert som negative), SN står for sann negativ (Decoys klassifisert som negative) og FP står for falsk positiv (Decoys klassifisert som positive).

$$\text{Sann positiv rate} = \frac{SP}{SP + FN}$$

$$\text{Falsk positiv rate} = \frac{FP}{FP + SN}$$

Ved å beregne areal under kurve (AUC) får vi en effektiv måling av nøyaktigheten til modellene. AUC oppsummerer hele plasseringen av ROC-kurven i stedet for å bare fokuserer på bestemte punkter. Ved å se på ROC-kurven og AUC-verdien får vi en effektivt mål på sensitivitet og spesifisitet (26). Sensitivitet defineres som sannsynligheten for at det virkelig er positiv, og spesifisitet defineres som sannsynligheten for at det virkelig er negativt.

En diagonal ROC-kurve indikerer at modellen er tilfeldig klassifisert og er derfor ikke i stand til å forskjellsbehandle mellom SP og FP. En ROC-kurve nærmere venstre hjørne og topp hjørne indikerer nøyaktig modell, og da er den modellen i stand til å klassifisere SP som bindingsligander og FP som decoys (Figur 7). Den maksimale AUC-verdien på 1 indikerer at den skiller mellom SP og FP perfekt. AUC-verdi på 0,5 indikerer at kurven ligger på diagonal linje og er ikke i stand til å forskjellsbehandle. AUC-verdi på 0 indikerer at den feilaktig klassifiserer alle (26).



Figur 7 Grafisk fremstilling av en ROC-kurve.

1.10 Virtuell screening (VS)

Virtuell screening er en metode som forutsier bindingen til target reseptor ved hjelp av datamaskinprogrammer. Eksperimentelle begrensinger som for eksempel løselighet, og aggregatdannelse trenger ikke å bli tatt hensyn til i denne fasen. Denne metoden krever kunnskap om de romlige og energiske kriterier. Disse kriteriene er ansvarlig for binding av liganden til 3D strukturen av target (eksperimentelt eller ved homologimodellering) (27).

Forskjellige VS strategier kan bli brukt avhengig av mengde og kvalitetstilgjengelige data. En strukturbasert virtuell ligand screening (SBVLS) protokoll, som generelt inkluderer dokkingsmetoder, kan bli brukt hvis strukturen av target ikke er kjent. Ligand basert virtuell ligand screening (LBVLS) protokoll kan inkludere likheter og bærestuktur søking (QSAR), farmakofor matching eller 3D form matching hvis en rigid ligandbinding til target er kjent. Hvis både informasjon om rigid ligand og target er kjent, kan disse protokollene kombineres.

2 Formål

Forståelse av molekyllmekanismer av GPER gir mulighet til å utvikle GPER agonister med bedre potens og selektivitet. Molekylmodeller bør generelt bli betraktet som en arbeidsredskap for å sette en hypotese og designe fremtidige eksperimentelle studier relatert til proteinstruktur, funksjon og legemiddelinteraksjoner. Undersøkelse av deres molekylære interaksjoner er svært nyttig for å designe nye ligander med terapeutisk potensial.

3D strukturen til GPER var ikke eksperimentelt kjent ved studiestart. Dermed har formålet med denne studien vært å bygge tre homologimodeller av GPER i en aktiv konformasjon. Homologimodeller skulle bygges basert på tre forskjellige templatere med kjente 3D strukturer.

Deretter skulle molekyldokking bli brukt for å få mer kjennskap til deres interaksjoner. Aminosyrer involvert i ligandbinding skulle identifiseres. Ut ifra dokkingen skulle det vurderes nøyaktigheten av de tre modellene ved å bruke ROC-kurve. ROC-kurvene til alle tre modellene skulle vurderes og den beste modellen skulle velges og brukes til virtuell ligand screening (VLS). Resultater fra VLS skulle evalueres og mulige legemiddelkandidater skulle foreslås. De foreslåtte legemiddelkandidater kan senere bli brukt til eksperimentelle studier.

3 Metoder

3.1 Programvarer

3.1.1 Molsoft Internal Coordinates Mechanics (ICM) (Versjon 3.8.5)

Molsoft molekylmodellerings teknologi er basert på Internal Coordinates Mechanics (ICM). Denne programvaren har blitt grundig validert i bioinformatikk og legemiddelprosjekter. Studier har vist at ICM er ikke bare i stand til å rekonstituere de mest kritiske protein-ligand kontakter, men er også i stand til å identifisere høyaffinitets ligander for de viktigste target klassene, for eksempel enzymer, reseptorer, ionekanaler og transportproteiner (28, 29). I denne studien ble programvaren brukt til å bygge homologimodell av reseptoren, molekyl-dokking og VLS.

3.1.2 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

BLAST er en del av National Center for Biotechnology Information (NCBI), som har mange databaser, programmer og verktøyer. BLAST er et verktøy som finner regioner med likheter mellom biologiske sekvenser. Programmet sammenligner proteinsekvenser i databaser og finner den proteinsekvensen som passer til. Programmet er tilgjengelig på <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Denne programvaren ble brukt til å finne proteiner med signifikant sekvenshomologi og kjente 3D strukturer til GPCR som kunne brukes som templatener i denne studien.

3.2 Databaser

3.2.1 The Protein Data Bank (PDB)

Protein Data Bank (PDB) er et oppbevaringssted som inneholder informasjon om 3D strukturer til store biologiske makromolekyler, inkludert proteiner og nukleinsyrer. Dette gjelder for alle organismer som bakterier, gjær, planter, fluer, andre dyr og mennesker. 3D strukturen av de biologiske makromolekylene har blitt bestemt ved eksperimentelle metoder som røntgenkristallografi, NMR spektroskopi eller elektronmikroskop. PDB inneholder per dags dato ca. 117 000 3D strukturer, rundt 1000 av disse er protein strukturer. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <http://www.rcsb.org/pdb/> (30). Denne databasen ble brukt til å laste ned krystallstrukturene til templatene.

3.2.2 Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProtKB)

UniProtKB er en omfattende proteinsekvens kunnskapsbase som består av to deler, 1) UniProtKB/Swiss-Prot, som inneholder kommentar oppføringer, og 2) UniProtKB/TrEMBL, som inneholder beregningsmessige analyser. UniProtKB/Swiss-Prot inneholder informasjon skrevet av biologer og gir brukerne tilgang til ca. 100 eksterne databaser. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <http://www.uniprot.org/> (31). Denne databasen ble brukt til å finne aminosyresekvensen til GPER.

3.2.3 ChEMBL

ChEMBL er en biologisk database som inneholder opplysninger om binding, funksjonelle egenskaper og ADMET (absorpsjon, distribusjon, metabolisme, ekskresjon og toksisitet) informasjon av et stort antall bioaktive forbindelser. Bioaktiviteten er beskrevet ved hjelp av K_I , K_D , IC_{50} og EC_{50} verdier. Databasen inneholder rundt 5,4 millioner bioaktive målinger for over en million forbindelser og 5200 protein-target. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db> (32). Denne databasen ble brukt til å søke etter forbindelser, target og analyser.

3.2.4 IUPHAR/BSP Guide to Pharmacology

IUPHAR/BSP gir farmakologiske, kjemiske, genetiske, funksjonelle og patofysiologiske data på target av godkjente eksperimentelle medikamenter, inkludert GPCR, ionekanaler og nukleære hormonreseptorer. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <http://www.guidetopharmacology.org> (33). Denne databasen ble brukt til å finne mer informasjon om GPER.

3.2.5 PubChem

PubChem er en database som inneholder informasjon om kjemiske stoffer og deres biologiske aktiviteter. Databasen er delt inn i tre deler: 1) Substanser, 2) Kjemiske strukturer og 3) Biologiske tester. PubChem inneholder mer enn 157 millioner substansbeskrivelser, 60 millioner kjemiske strukturer og 1 million toksiske målinger. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (34). Denne databasen ble brukt til å finne aktive og inaktive forbindelser til GPER og laste ned SMILES.

3.2.6 eMolecules

eMolecules er en database som er delt inn i tre deler: 1) Byggeblokker, 2) Screening forbindelser og 3) Antistoffer. Databasen inneholder over 1,5 millioner byggeblokker, over 7 millioner screenings forbindelser og over 600 000 antistoffer. Man har mulighet til å velge bærestruktursøk, eksakt struktursøk eller likhetssøk og bestille disse forbindelser til eksperimentelle studier. Ved likhetssøk har man mulighet til å velge hvor stor prosent likhet det skal være med angitt struktur. Databasen er tilgjengelig på følgende nettside: <https://www.emolecules.com/>. Denne databasen ble brukt til å finne strukturlike forbindelser og bruke de til VLS.

3.3 Homologimodellering

Når denne studien ble startet hadde ikke 3D strukturen til GPER blitt eksperimentelt bestemt. Dermed ble det brukt ICM homology modeling module til å generere GPER modeller og eventuelt finne nye agonister som kan blir brukt som legemiddelkandidater.

3.3.1 Templat identifisering

Proteinsekvensen til GPER ble funnet i www.Uniprot.org databasen. Søket gav UniProt nummer Q99527 (gper1_human) som var human sekvens og tilhørte familie klasse A (Rhodopsin). Denne sekvensen hadde en lengde på 375 aminosyrer og ble brukt som target i denne studien. FASTA filen ble lastet ned og brukt til å finne proteiner med signifikant sekvenshomologi og kjent 3D strukturer som kunne brukes som templat i denne studien. Databasen som ble brukt tilhørte National Center for Biotechnology Information (NCBI) og heter Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Protein-protein BLAST programmet ble valgt til å sammenligne GPER sekvensen med templat sekvensen. Templatet som skulle velges måtte ha følgende kriterier: 1) Høyest mulig homologi til target, 2) Inneholde bindingssete i kompleks med en ligand og 3) Høyest mulig oppløselighet (Å) som mulig. Det skulle velges tre templat til denne studien, men søket gav tilsammen en liste på 52 proteiner med signifikant sekvenshomologi til GPER. Listen måtte kortes ved å ta hensyn til de tre tidligere nevnte kriterier. En annen ting som også var viktig å ta hensyn til var forventet e-verdi. Listen ble dermed sortert etter stigende e-verdi. E-verdi er en parameter som beskriver antall treff til å oppstå ved tilfeldighet alene under databasesøk.

Jo nærmere e-verdien var til null, jo mer signifikant var likheten. Proteiner med e-verdi >0,0001 ble ekskludert, og dermed ble listen kortet til 26 proteiner med signifikant sekvenshomologi til GPER.

Deretter ble alle GPCR i klasse A bundet til en agonist valgt ved å velge en query cover over 70%. De tre best egnede reseptorer med røntgenkrystallografi struktur, høyest sekvenslikhet og høyest oppløselighet bundet til forskjellige agonister ble valgt (Tabell 2) og brukt som templatere for modellering av GPER.

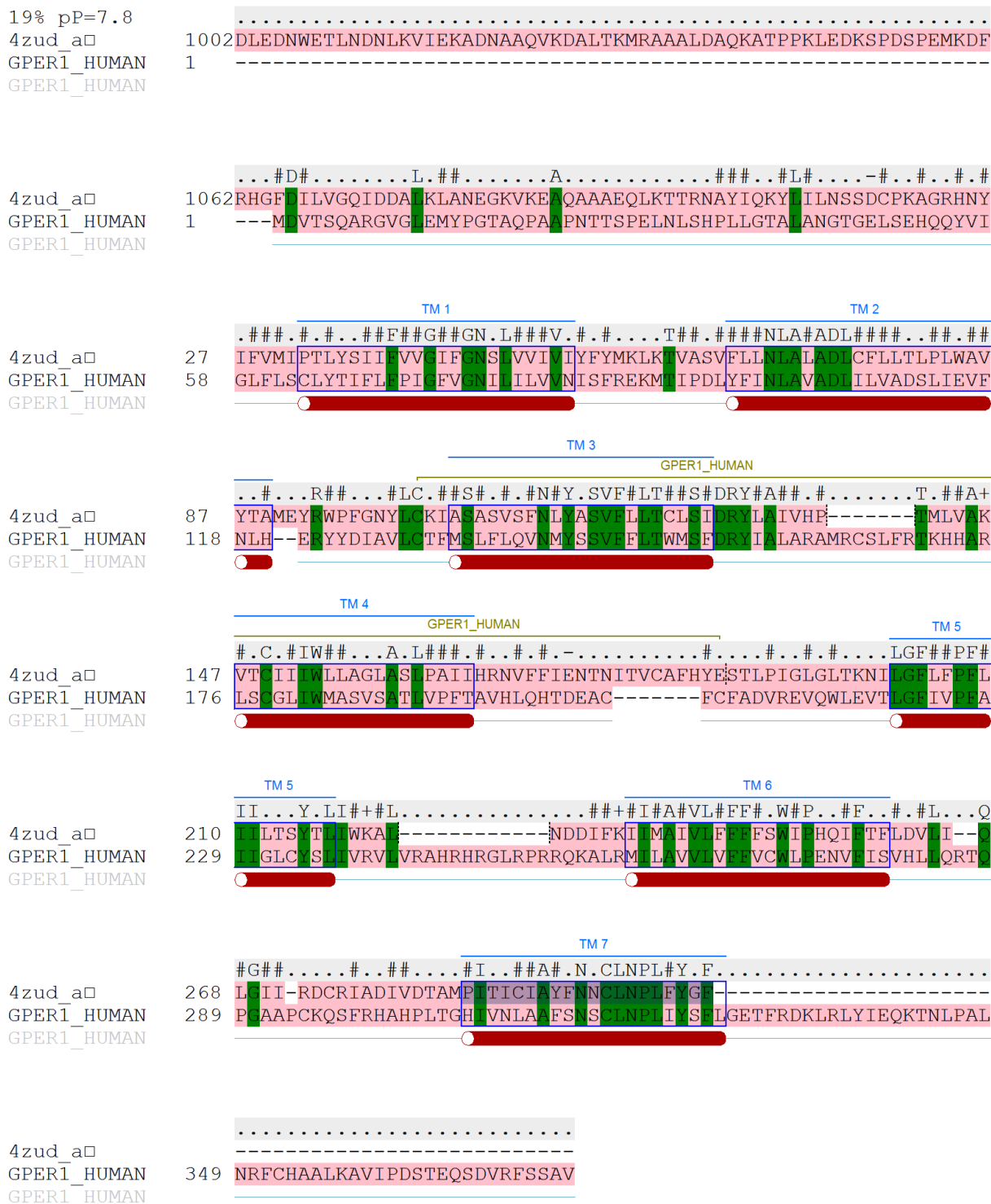
Tabell 2 Oversikt over tre valgte templatere som ble brukt til molekylmodellering.

PDB ID	Struktur navn	Query cover %	Sekvenslikhet %	Oppløselighet Å	Forfatter	Pubmed ID
4YAY	XFEL structure of human Angiotensin Receptor	73	32	2,9	Zhang, H., Unal, H., Gati, C., Han, G.W., Liu, W., Zatsepin, N.A., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Sawaya, M.R., Xu, Q., Messerschmidt, M., Williams, G.J., Boutet, S., Yefanov, O.M., White, T.A., Wang, C., Ishchenko, A., Tirupula, K.C., Desnoyer, R., Coe, J., Conrad, C.E., Fromme, P., Stevens, R.C., Katritch, V., Karnik, S.S., Cherezov, V.	25913193
4ZUD	Crystal Structure of Human Angiotensin Receptor in Complex with Inverse Agonist Olmesartan at 2.8Å resolution.	73	32	2,8	Zhang, H., Unal, H., Desnoyer, R., Han, G.W., Patel, N., Katritch, V., Karnik, S.S., Cherezov, V., Stevens, R.C.	26420482
4XT1	Structure of a nanobody-bound viral GPCR bound to human chemokine CX3CL1	71	33	2,89	Burg, J.S., Ingram, J.R., Venkatakrishnan, A.J., Jude, K.M., Dukkupati, A., Feinberg, E.N., Angelini, A., Waghray, D., Dror, R.O., Ploegh, H.L., Garcia, K.C.	25745166

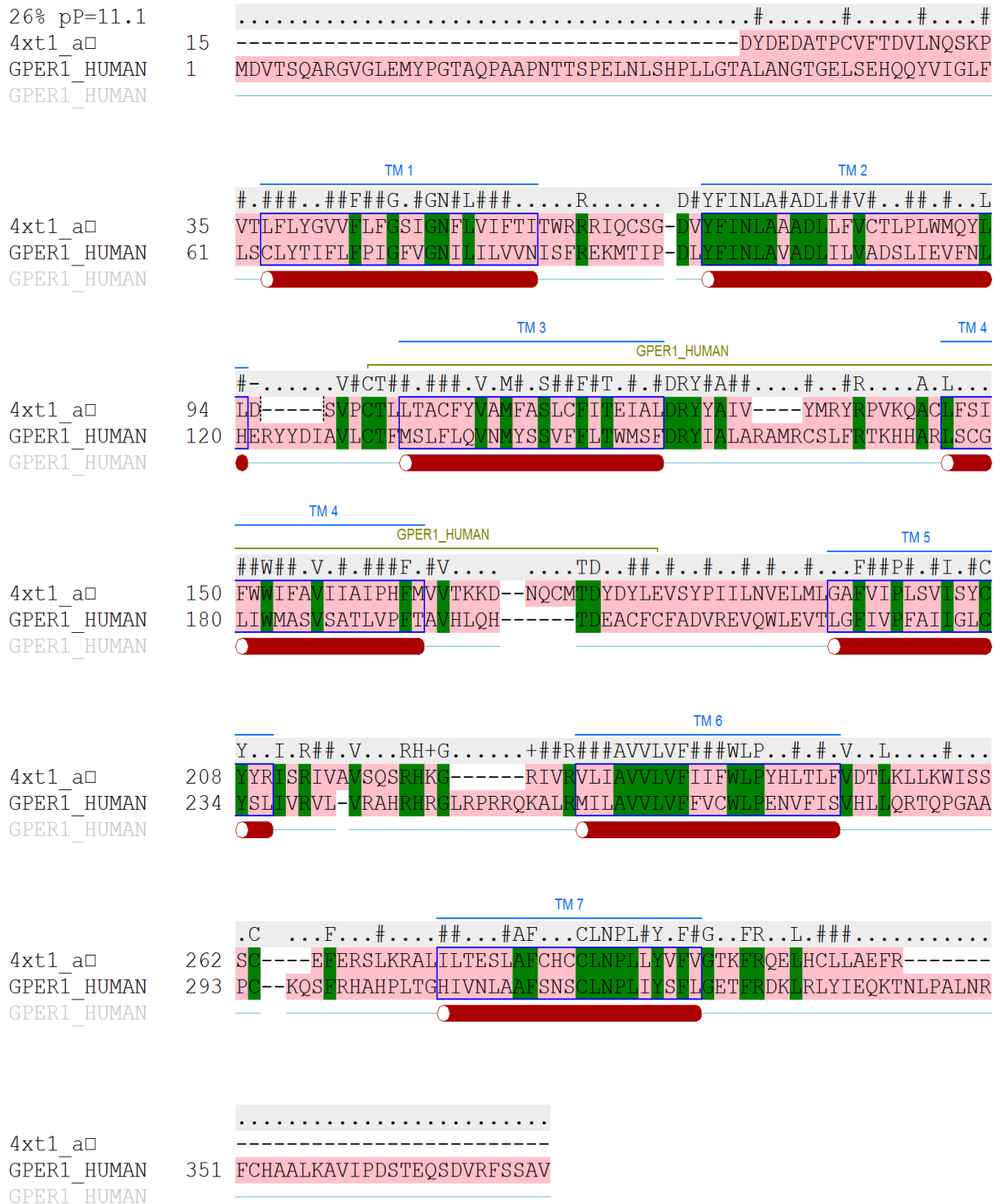
3.3.2 Target-templat alignment

De tre valgte templatene for modellering av GPER hadde følgende PDB ID: 4YAY, 4ZUD og 4XT1. GPER ble innregulert med sekvensen av templatet ved å bruke ICM sin innebygde alignment verktøy. Start- og endepunkt av GPER TMH ble hentet fra Swiss-Prot-databasen. Alignmentet måtte med forsiktighet kontrolleres og justeres ved å bruke Ballesteros nomenklatur (35) som veileder. Ballesteros sin nomenklatur inneholder aminosyrer som blir funnet i alle GPCR klasse A reseptorer. Disse aminosyrene er Asn (N) i TM1, Asp (D) i TM2, Arg (R) i TM3, Trp (W) i TM4, Pro (P) i TM5, Pro (P) i TM6 og Pro (P) i TM7. Det måtte forsikres at disse aminosyrene i TM områdene var i samme posisjon i templatet og target.

Samtidig måtte alle tomrom i TMH av GPER fjernes manuelt i ICM, dette ble gjort for å sikre at aminosyrene i helikser og cystein-broer mellom heliksene var i riktig posisjon. Den endelige target-templat alignmentet (Figur 8, 9 og 10) ble brukt til å bygge GPER modeller.



Figur 9 Sekvensalignement av GPER og 4ZUD som ble brukt til homologimodellering. Områder med mørkegrønn farge viser identiske aminosyrer med templatet. Gul merket område viser disulfidbinding for brukt templat. TM 1-7 er markert i blå bokser.



Figur 10 Sekvensalignement av GPER og 4XT1 som ble brukt til homologimodellering. Områder med mørkegrønn farge viser identiske aminosyrer med templatet. Gul merket område viser disulfidbinding for brukt templat. TM 1-7 er markert i blå bokser.

3.3.3 Modellbygging av GPER

Tre GPER modeller ble bygd basert på tre krystallstrukturer:

- Første modellen ble bygd basert på XFEL strukturen av human angiotensin reseptor med PDB ID 4YAY (36) og en oppløselighet på 2,9 Å.
- Andre modellen ble bygd basert på krystallstrukturen til human angiotensin reseptor i kompleks med invers agonist olmesartan med PDB ID 4ZUD (37) og en oppløselighet på 2,8 Å.
- Tredje modellen ble bygd basert på strukturen av en nanobody-bundet viral GPCR bundet til human kjemokin CX3CL1 med PDB ID 4XT1 (38) og en oppløselighet på 2,89 Å.

Alle tre templatene som modellene ble bygd av tilhørte GPCR familie klasse A (Rhodopsin) og var de mest egnede kandidater tilgjengelig med hensyn på de tre kriterier som ble nevnt tidligere. De tre bygde modellene ble kalt 4YAY-, 4ZUD- og 4XT1-basert modell.

3.3.4 Modelljustering

For å justere de tre modellene ble det brukt en innebygd innstilling i ICM, som optimaliserte sidekjeder og avspente hovedkjeder. Denne innstillingen inkluderte tre ting; 1) Monte Carlo fast (39) simulering for sampling av konformasjonsavstand av sidekjeder, 2) Gjentakende avspenning av hovedkjeder, og 3) Andre gangs Monte Carlo simulering på sidekjeder. Ved gjentakende prosesser forsøkt konformasjonsavstand av molekylet med ICM global optimaliserings prosedyre. Denne prosedyren besto av tilfeldig bevegelser og energi minimering, og deretter en fullstendig energi beregning. Basert på energien og temperaturen, ble gjentakelsen enten akseptert eller avvist (39).

3.3.5 Modellvalidering

SAVES (<https://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) ble brukt til å analysere og validere proteinstrukturene. De valgte programmene for å validere modellene var PROCHECK, WHATCHECK og ERRAT. PROCHECK kontrollerte stereo kvaliteten av proteinstrukturene ved å analysere residue-by-residue geometri og generell struktur geometri (40).

WHATCHECK tok en omfattende kontroll av mange stereo parametere av aminosyrer i

modellen (41). Den siste programmet som ble brukt var ERRAT. ERRAT analyserte statistikken av ikke-bundet interaksjoner mellom ulike atomtyper og beregnet verdien av feilfunksjon i forhold til posisjon. Dette ble beregnet ved å sammenligne med statistikken fra høyt raffinerte strukturer (42).

Det ble også kontrollert den samlede 3D strukturen av modellene ved at de ble superponert deres korresponderende templat, og root-mean-square deviation (RMSD) verdien ble beregnet i ICM. RMSD verdien beskriver strukturforskjeller mellom modellen og templatet.

3.4 Dokking og scoring

3.4.1 Datasett med agonister og decoys

Et sett av agonister og decoys ble lastet ned fra PubChem for å validere modellenes evne til å skille mellom agonister og decoys. Hensikten her var å finne den mest egnede modellen av de tre modellene til å bruke videre i denne studien. Søkeord GPER protein [Homo sapiens] ble valgt til å finne riktig bioassay. Dermed ble bioassay med navnet: GPR30 binding: Primary Screen, PubChem AID 1212 valgt. De andre datasettene ble ikke valgt på grunn av få forbindelser til å kunne sammenligne forholdene mellom sann positiv og falsk positiv. Datasettet som ble valgt inneholdte 136 inaktive og 15 aktive (Appendiks A). De aktive forbindelsene ble antatt til å være agonister og de inaktive ble antatt som decoys. Alle 151 forbindelsene ble lastet ned som SDF filtype. Listen ble lastet ned i ICM og SMILES ble endret til 2D strukturer.

3.4.2 Ligand og reseptor forberedelse

Før dokking måtte både ligandene og modellene tilberedes. Både agonister og decoys måtte bli forandret fra 2D til 3D og formell ladning under fysiologiske betingelser (pH=7) ble tilført der det var nødvendig av ICM. Modellene måtte også forberedes til dokking. Hydrogen ble optimaliser, etterlate sidekjerder ble skjult og HisProAsnGlnCys ble optimalisert.

3.4.3 Identifisering av ligand-bindingssete

Riktig valg av bindingssete var en viktig prosess. Informasjon om bindingssetet kan fås fra tre ulike måter: 1) Ved å sammenligne target protein med en familie av proteiner som har liknende funksjon, 2) Proteiner krystallisert med andre ligander eller 3) Fra seterettete

mutagenese studier. Det fantes ingen seterettete mutagenese studier av GPER, dermed ble templatene brukt til å generere ligand-bindingssetet i modellene. For å finne riktig bindingssete ble modellene superponert deres korresponderende templat med liganden. Siden både templatene og modellene hadde samme konformasjon, ble det antatt at bindingssetet i templatet og modellen var på samme sted. Aminosyrer i modellene rundt bindingssetet ble valgt og brukt til å markere bindingssetet i modellene.

3.4.4 Dokking av agonister

Semi-fleksibel dokking ble anvendt i denne studien. Denne dokkingsprosessen beholdte reseptoren rigid og liganden fleksibel. Ligandbindings posisjonen i bindingssetet ble forutsett av ICM med hjelp av Monte Carlo globalisering prosedyre. De tidligere nevnte 151 forbindelsene ble dokket ved hjelp av batch dokkingsmetode i ICM. Tre parallelle dokkinger ble kjørt for alle tre modellene og den beste resultatet ble valgt og evaluert.

3.4.5 ROC- kurve

Dokkingene ble evaluert ved å bruke ROC-kurver. De positive (agonister dokket) ble merket som 1, mens de negative (decoys dokket) ble merket som 0. Score verdien fra resultatet som ble oppnådd fra dokkingen ble analysert ved å bruke ROC-kurve kommando i ICM. Resultatet ble vist som en ROC-kurve og AUC-verdiene ble kalkulert og tolket.

3.5 Virtuell ligand screening (VLS)

Den beste GPER modellen som var i stand til å skille mellom sann positiv og falsk positiv, basert på ROC-kurve resultatet, ble brukt for VLS. Agonisten (forbindelse nr.149) med høyest affinitet blant 15 dokkede forbindelsene ble brukt til å screene flere tilgjengelige forbindelser. Databasen fra www.emolecules.com ble brukt til å finne forbindelser som lignet på forbindelse nr. 149. Fra screening ble totalt 3544 forbindelser med 50% strukturell likhet med valgt forbindelse funnet og dokket inn i 4YAY-basert modellen. Deretter ble det laget en hitliste og 20 forbindelser som hadde høyest score verdi og druglikeness valgt. ICM sin druglikeness score er beregnet basert på 5000 markedsførte legemidler fra World Drug Index (WDI) (positive) og 10 000 ikke-medisinske forbindelser (negative) (43).

4 Resultater og diskusjon

4.1 Homologimodellering

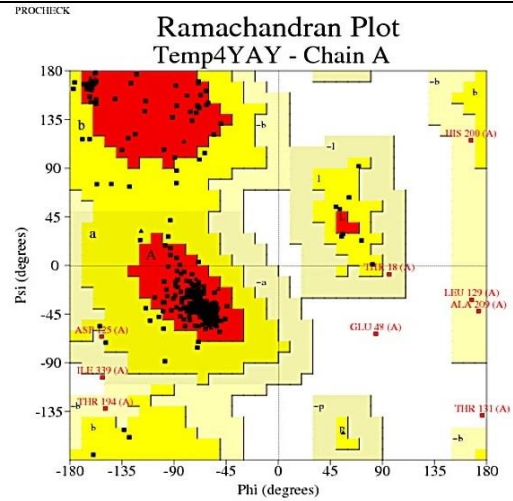
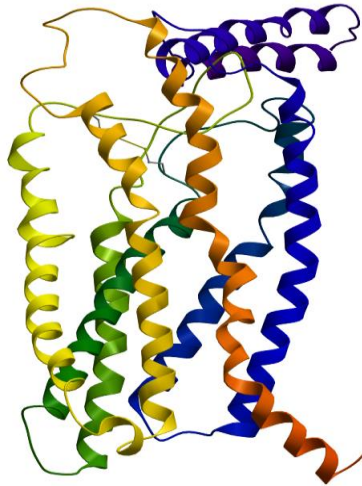
Kjennskap til 3D strukturen til GPER gir oss viktig informasjon om ligandbindings interaksjoner. Når denne studien ble startet hadde ikke 3D strukturen til GPER enda blitt eksperimentell bestemt, dermed var homologimodellering et alternativ som ble brukt.

I fravær av en tilgjengelig røntgenkrystallografi struktur av GPER, ble det bygd GPER homologimodell basert på struktur av dets nærmeste homologt protein. GPER modellene ble bygd ved å bruke tre kjente strukturer som templatler med like biologiske og kjemiske egenskaper hentet fra PDB. Templatene hadde PDB ID: 4YAY, 4ZUD og 4XT1. Disse hadde en sekvenslikhet på 32 % og 33% og oppløselighet på 2,9 Å, 2,8 Å og 2,89 Å (Se tabell 2). Sekvensalignment av modellene og templatler ble justert ifølge Ballesteros nomenklatur for å øke nøyaktigheten av modellene. Etter justering av alignmentene falt sekvenslikheten til 22% (4YAY), 19% (4ZUD) og 26% (4XT1). Modellene hadde lav sekvenslikhet med deres korresponderende templatler. Dette var hovedsakelig på grunn av begrenset antall tilgjengelige templatler for på nært hold homologi (>50% sekvenslikhet) modellering og dessuten færre for agonist bundet templatler til å bygge aktive konformasjoner av target protein. Det er også viktig å tenke at sekvenslikhet alene ikke kan bestemme hvilke templat som vil gi den beste og mest nøyaktige modellen. Strukturinformasjon (f.eks. struktur oppløselighet) må også bli tatt hensyn til ved valg av templat for homologimodellering (44).

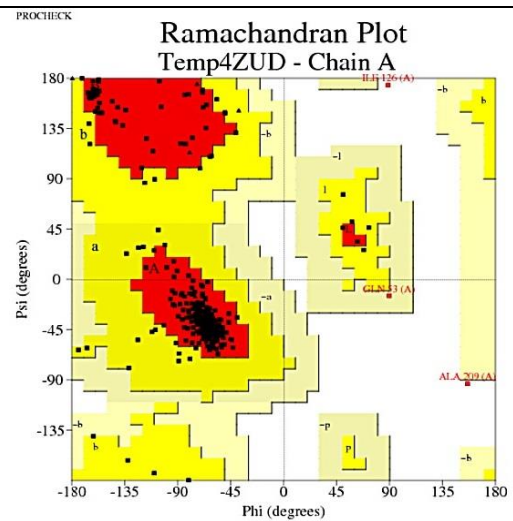
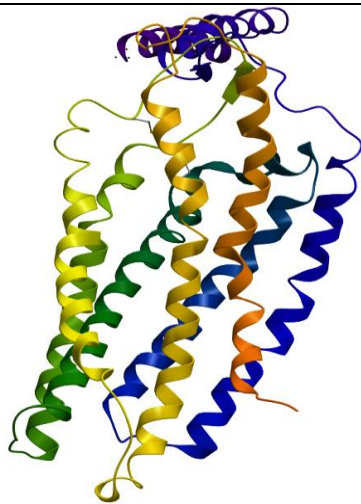
Totalt ble det bygd tre GPER modeller ved å bruke homologimodellerings metoden i ICM. De tre endelige modellene ble kalt 4YAY-basert modell, 4ZUD-basert modell og 4XT1-basert modell (Figur 11) og ble brukt videre i denne studien. Modellene hadde en typisk klasse A GPCR struktur, bestående av 7TM områder sammenkoblet av tre ekstracellulære looper og tre intracellulære lopper, N-terminal og C-terminal.

N-terminalen var synlig i 4YAY-basert modell og 4ZUD-basert modell, men ikke i 4XT1-basert modell. C-terminalen var heller ikke synlig i alle modellene. Dette var på grunn av at det ikke var noen templatler som hadde rekkevidde for dets modellering (Se figur 8, 9 og 10). 4YAY templatet hadde 414 aminosyrer, 4ZUD hadde 410 aminosyrer og 4XT1 hadde 362 aminosyrer, mens GPER hadde 375 aminosyrer. Dette gjør at N-terminal og C-terminal ikke blir synlig i alle modellene.

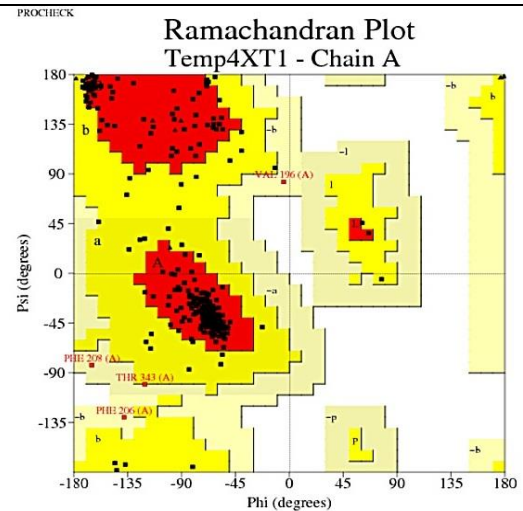
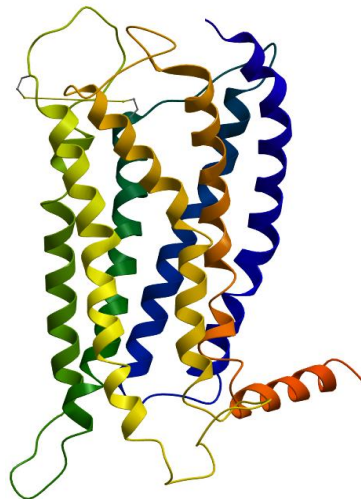
4YAY-
basert
modell



4ZUD-
basert
modell



4XT1-
basert
modell



Figur 11 Ramachandran Plot av alle tre modellene. TMH er fargekodet, fra blå (TM1) til rød (TM7). Figurer ble hentet fra ICM. Ekstracellulær område øverst på figuren og intracellulær område nederst på figuren. Modell 1 er 4YAY basert modell, modell 2 er 4ZUD basert modell og modell 3 er 4XT1 basert modell. Ramachandran Plot er hentet fra PROCHECK for modell 1, 2 og 3. PROCHECK viser aminosyrer i foretrukket (rød), ytterligere tillatt (gul), sjenerøst tillatt (lys gul) og ikke tillatt (hvit) område.

Selv med lav sekvenslikheter kunne modellene bygges basert på felles 7TM struktur av GPCR klasse A og tilstedeværelse av viktige aminosyrer i hver TM helikser.

På høyre siden av figur 11 ser vi en grafisk fremvisning av Ramachandran plot fra PROCHECK. Ramachandran plot viser stereokjemiske evaluering av hovedkjeder Psi (Ψ) og Phi (Φ) vinklene mellom to plan. I følge Ramachandran plot av modellene var 87,4 % i foretrukket område, 10,0% i ytterligere tillatt område, 1,8% (Thr 18, Leu 129, Thr 194, His 200, Ala 209 og Ile 339) i sjenerøst tillatt område og 0,9% (Glu 48, Thr 131 og Ile 339) i ikke tillatt område for 4YAY-basert modell. For 4ZUD-basert modell var 88,2% i foretrukket område, 10,9% i ytterligere tillatt område, 0,3% (Gln 53) i sjenerøst tillatt område og 0,6% (Ile 126 og Ala 209) i ikke tillatt område. For 4XT1-basert modell var 87,1% i foretrukket område, 11,8% i ytterligere tillatt område, 1,2% (Ala 41, Val 196, Phe 206 og Phe 208) i sjenerøst tillatt område og ingen i ikke tillatt område (Tabell 3). Ingen av aminosyrene i sjenerøs tillatt område og ikke tillatt område var plassert i antatt bindingssete av GPER modellene.

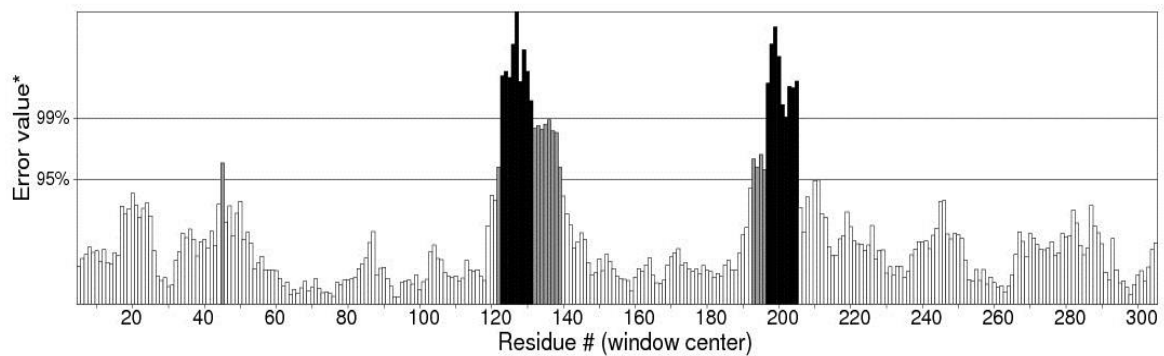
Tabell 3 Ramachandran Plot statistikk fra PROCHECK.

Modell	Foretrukket område	Ytterligere tillatt område	Sjenerøst tillatt område	Ikke tillatt område
4YAY-basert modell	87,4 %	10,0 %	1,8 %	0,9 %
4ZUD-basert modell	88,2 %	10,9%	0,3 %	0,6 %
4XT1-basert modell	87,1 %	11,8 %	1,2 %	0,0 %

Basert på analyse av 118 strukturer med oppløselighet på minst 2,0 Å og R-faktor ikke høyere enn 20%, forventes en god kvalitet modell å ha over 90% i foretrukket område (PROHECK). Fra tabellen ser vi at modellene som ble bygd i denne studien hadde under 90% i foretrukket område, men var ganske nært (87,4%, 88,2% og 87,1%). Det kan konkluderes med at disse modellene var av god kvalitet.

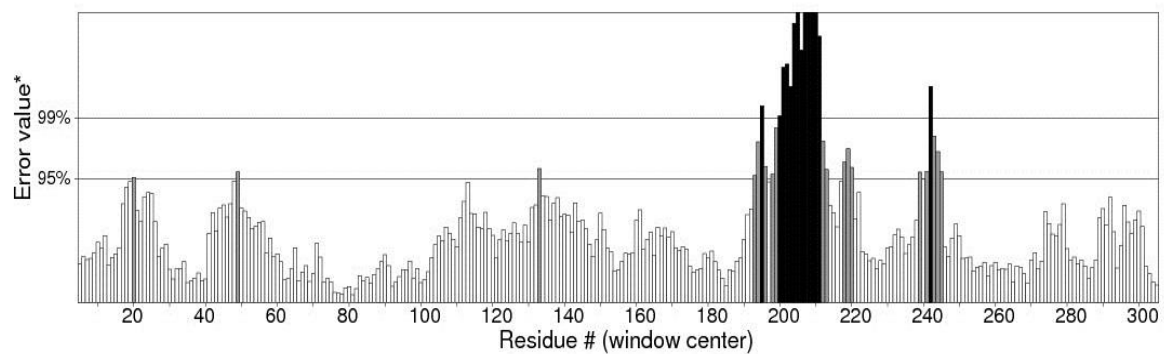
4YAY- basert modell

Overall quality factor**: 90.208



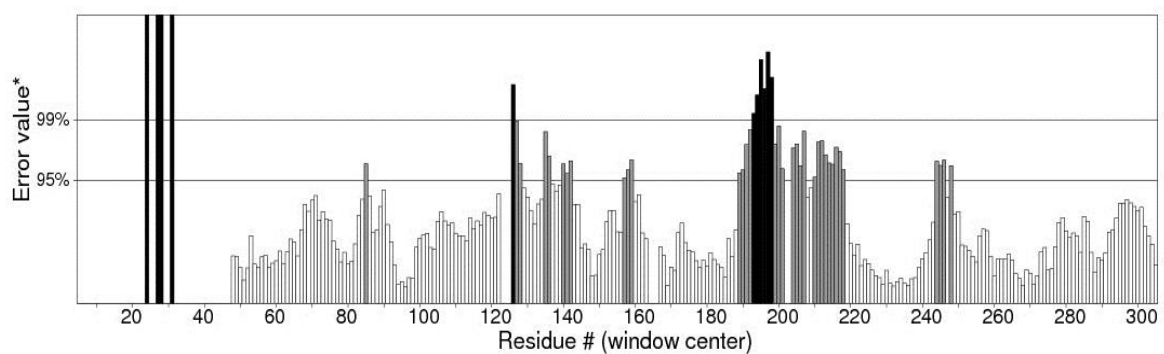
4ZUD- basert modell

Overall quality factor**: 89.815



4XT1- basert modell

Overall quality factor**: 83.673

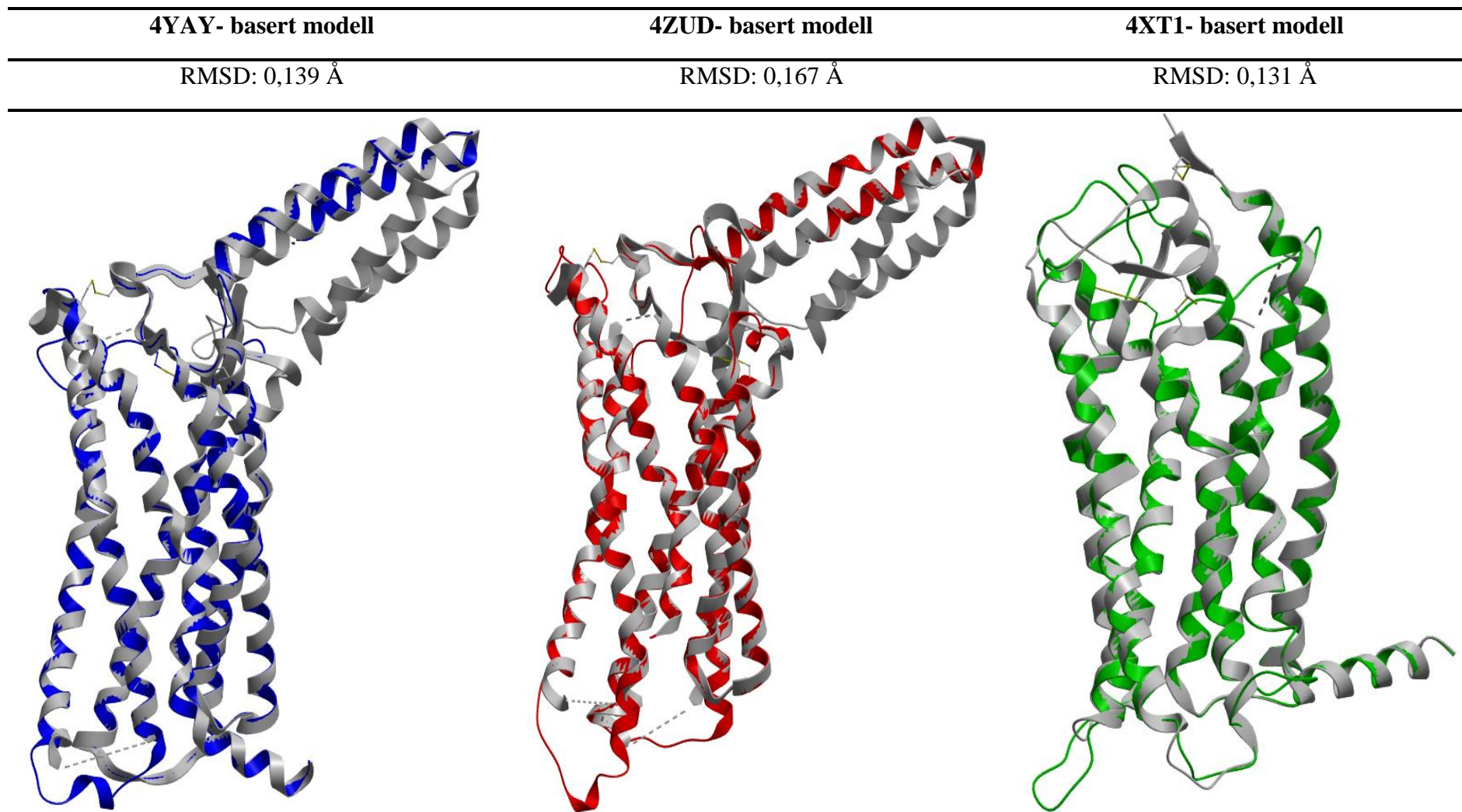


Figur 12 ERRAT plot for 4YAY-, 4ZUD- og 4XT1- basert modell. ** Uttrykt som prosent av proteinet som den beregnede feilverdien faller under 95% avvissingsgrense. Høy oppløselighets strukturer gir generelt verdier rundt 95% eller høyere. For lavere oppløseligheter (2,5-3 Å) er den gjennomsnittlige totale kvalitetsfaktoren rundt 91% (PROCHECK).

ERRAT viser analysen av de statistisk ikke-bundet interaksjoner mellom forskjellige atomtyper. Høy score indikerer at modellen har høy kvalitet. ERRAT analysen fra SAVES rapporterer den samlede kvalitetsfaktoren av modellene. Alle tre modellene hadde en ERRAT verdi over 80%. 4YAY-basert modell hadde den høyeste ERRAT verdien på 90,208%, mens 4ZUD-basert modellen hadde 89,815% og 4XT1-basert modellen hadde 83,673% (Figur 12). Generelt aksepteres verdier over 50% for høy kvalitets modeller (45). Analysen beviste at ikke-bundet interaksjoner av GPER modellene passet godt i rangering av høy kvalitets modeller. ERRAT og PROCHECK analyse resultatet indikerte at modellene var av anstendig stereokjemisk kvalitet. WHATCHECK bekreftet også at modellene hadde tilfredsstillende kvalitet.

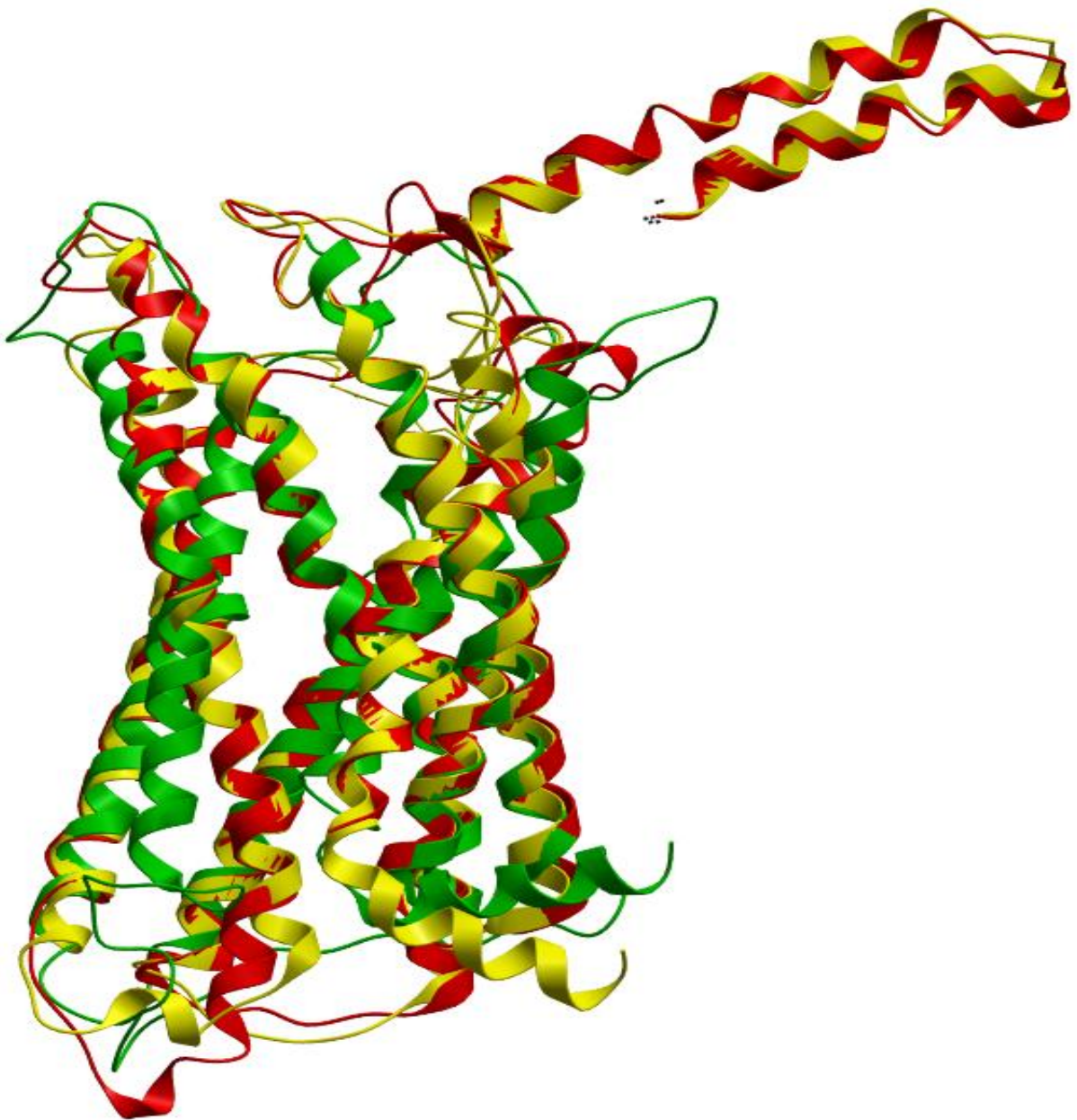
For å identifisere strukturforskjeller mellom modellene og deres templat, ble 3D modellene superponert deres korresponderende templat og RMSD verdien mellom hovedkjede α -karbon atomer beregnet. Dette ble gjort for å kontrollere hvor mye modellene lignet på deres templat. RMSD verdien beskriver den strukturelle forskjellen mellom modeller og deres templat. En lav RMSD verdi indikerer mindre strukturforskjell. 4YAY-basert modell hadde en sekvenslikhet på 32% og RMSD verdi på 0,139 Å. 4ZUD-basert modell hadde en sekvenslikhet på 32 % og RMSD verdi på 0,167 Å. 4XT1-basert modell hadde en sekvenslikhet på 33% og den laveste RMSD verdien av alle tre modellene på 0,131 Å (Figur 13). Til tross for lav sekvenslikhet, var modellene godt superponert deres korresponderende templat.

Loop områder i modellene var mest krevende områder i alignmentet. Dette var fordi de hadde forskjellig type aminosyrer og loop lengder. Mest forskjell mellom 4YAY-basert modell og templatet ser vi i ICL3, der modellen hadde en lenger ICL3 enn templatet. Templatet hadde også en lengre N-terminal enn 4YAY-basert modellen. Største forskjellen mellom 4ZUD-basert modell og templatet var i ICL2 og ICL3. Denne modellen hadde en lenger ICL2 og ICL3 enn templatet. Her også hadde templatet en lengre N-terminal enn 4ZUD-basert modellen. Forskjellen mellom 4XT1-basert modell og templatet var at modellen hadde en lengre ICL3 enn templatet. Siden bindingssetet var av størst interesse i denne studien, ble det ikke fokusert så mye på loop områder. De lave RMSD verdiene og små variasjoner mellom modellene og templatene viste at det var lite strukturelle forskjeller mellom dem.



Figur 13 Modeller som er superponert deres korresponderende templat. Venstre: 4YAY- basert modell (blå), midten: 4ZUD- basert modell (rød) og høyre: 4XT1- basert modell (grønn). Templater er vist i grå farger.

Når de tre modellene (4YAY-, 4ZUD- og 4XT1-basert modell) blir superponert, ser vi noe strukturforskjeller (Figur 14). 4YAY-basert modellen og 4ZUD-basert modellen er ganske like, der vi ser N-terminalen. 4XT1-basert modellen skiller seg litt ut og mangler N-terminal. Dette var fordi 4XT1 templatet hadde færre aminosyrer i sekvensen enn de to andre templatene. Derfor ble det ikke bygd N-terminal på grunn av manglende sekvens rekkevikke. Når de tre modellene ble superponert fikk vi en RMSD verdi på 0,820 Å. Dette viste at det ikke var så store strukturforskjeller mellom de tre bygde modellene.



Figur 14 Tre modeller superponert. Gul: 4YAY-basert modell, rød: 4ZUD-basert modell og grønn: 4XT1-basert modell. (RMSD: 0,820 Å)

4.2 Dokking og scoring

Dokking er en metode som brukes til å forutsi mulig ligandbindingssete av en target protein. Studier på bindingssete av GPER kan skaffe innsiktsfulle informasjoner om interaksjoner og karakteristiske trekk i en novel drug design. Molekylære interaksjoner mellom et legemiddel og dets target i menneskekroppen kan undersøkes ved hjelp av molekylære modelleringsteknikker. Interaksjonene mellom et legemiddel og target kan føre til forståelse av de intermolekylære krefter som bestemmer spesifisiteten og stryken av legemidler. Interaksjonen som oppstår kan gi innsikt i de strukturelle endringene i både legemidlet og legemiddel target. Den innhentede informasjonen kan brukes videre til å forutsi hvordan designet legemiddel vil passe inn i target. Nye kjemiske forbindelser med færre bivirkninger kan bli utformet og brukt som et legemiddel. GPER modellene ble dokket med kjente agonister for å undersøke mulig forutsigelse og hjelpe med å designe rasjonelle agonister. Agonister ble dokket i antatte bindingssete i alle tre modellene.

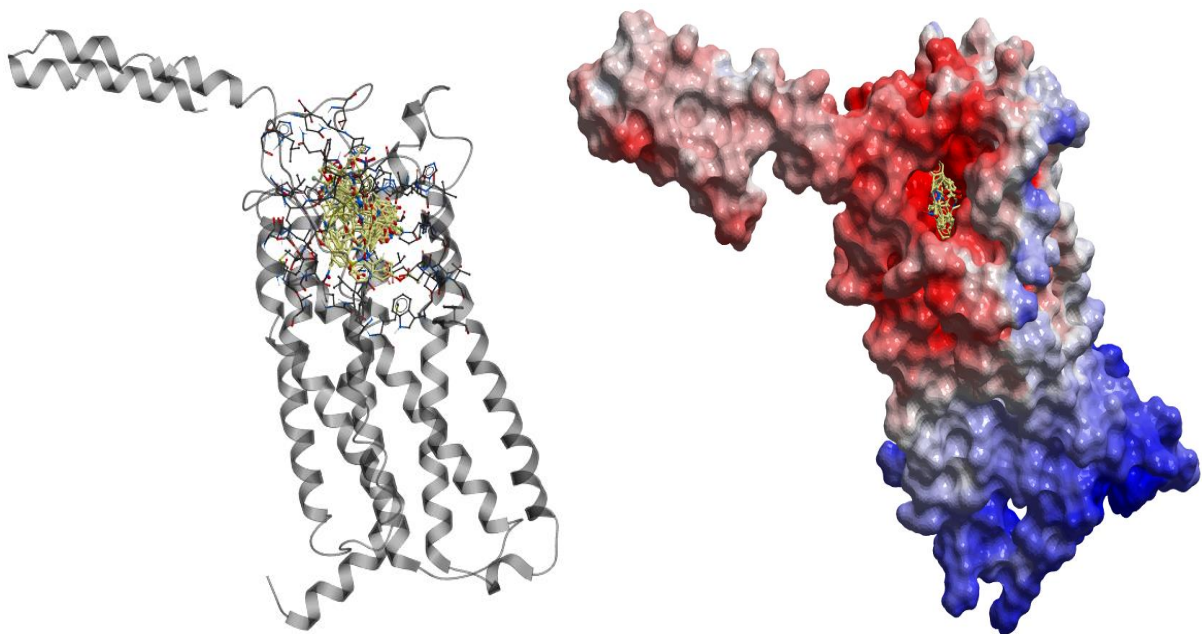
Proteiner som deler sekvenshomologi er kjent for å ha lignende 3D struktur og vanligvis lignende biologiske funksjoner (46). Basert på denne teorien ble det brukt templatere til å bestemme bindingssetet av GPER modellene i denne studien. Bindingssetet ble valgt ved å sammenligne target protein med dets korresponderende templat. Det ble antatt at bindingssetet til liganden i templatet var på samme sted som i de tre bygde modellene. Aminosyrer funnet i bindingssetet er presentert i tabell 4.

Tabell 4 Aminosyrer som former bindingssete i 4YAY-, 4ZUD- og 4XT1-basert modell.

Modell	Aminosyrer som former bindingssetet
4YAY- basert modell	H52, Q53, L119, Y123, L198, D202, E275, F278, I279, H282, H302, P303, G306, H307, V309 og N310.
4ZUD- basert modell	C130, S134, L137, Q138, V191, P192, A195, V196, C207, F208, A209, V211, R212, Q215, H282, L283 og R286.
4XT1- basert modell	C130, S134, L137, Q138, P192, V196, T201, C207, V211, V214, Q215, E218, F278, I279, H282, R286 og N310.

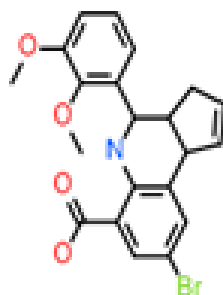
Under reseptoraktivering beveger TM6 og TM7 seg rundt en sving. Små agonister kan stabilisere en slik aktiv konformasjon, der de ekstracellulære segmentene av TM6 og TM7 bøyes innover mot TM3 ved å virke som molekyl-lim dypt i hoved ligandbindingssetet mellom heliksene. Større agonister, peptider og proteiner, kan stabilisere en lignende konformasjon ved å fungere som en borrelås i de ekstracellulære endene av heliksene og forbinde loopene. Under aktivering og G-proteinbinding kan en agonist bidra til å stabilisere den store forskyvningen i TM6 som skjer sammen med bevegelser i reseptorer. Denne stabiliseringen har vist seg å forekomme gjennom interaksjon av en agonist med TM6 (47, 48).

For å evaluere de tre bygde GPER modellenes evne til å skille mellom agonister og decoys forbindelser, ble de tre modellene dokket med 15 agonister og 136 decoys (Appendiks A) i en semi-fleksibel form. Alle agonister hadde benzen ring, minst en nitrogen og minst tre oksygen atomer i molekylet. Score verdier for dokkingen varierte fra +7 til -28, avhengig av hvilke modell som ble brukt og ligand. Når agonister ble dokket ble det observert dårlig score verdi. Årsaken til dette kan være at bindingssete var for trangt.



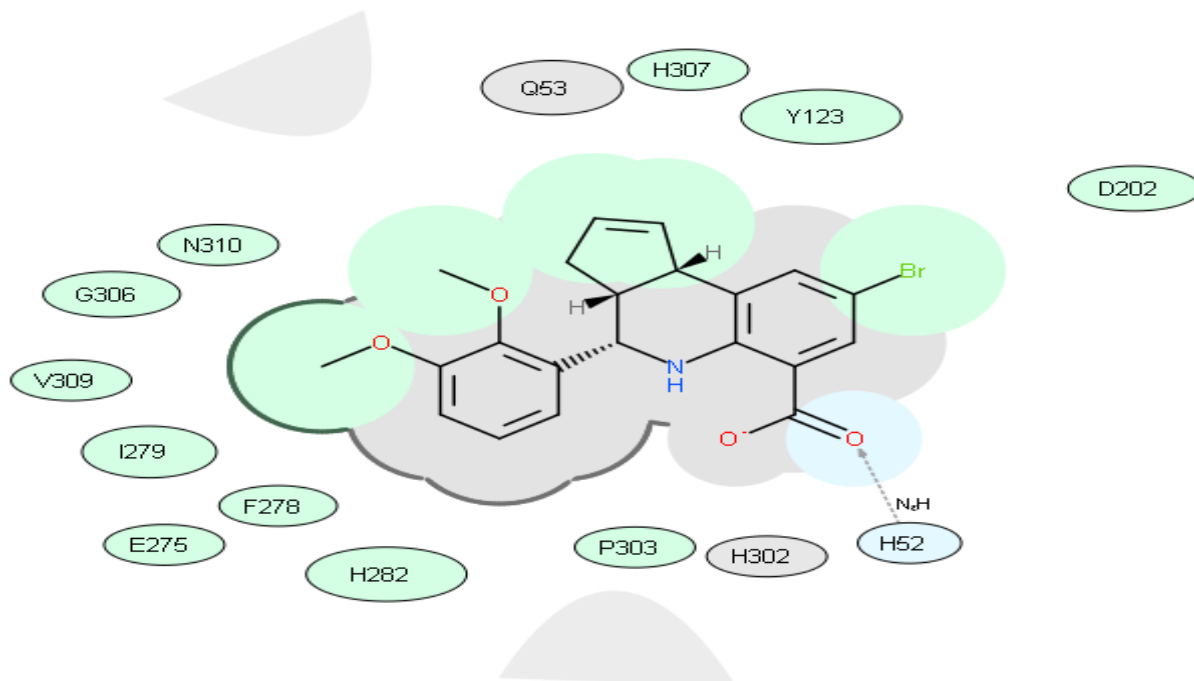
Figur 15 Bindingssetet til 4YAY-basert modell vist i ribbon og elektrostatiske potensial. Venstre: Aminosyrer i bindingssetet vist som wire og 4YAY-basert modell vist i ribbon i grå. Høyre: 4YAY-basert modell i elektrostatiske potensial. Fargekode; rød: negativ, blå: positiv og hvit: nøytral. Ekstracellulær område er øverst på figuren og intracellulær område er nederst på figuren.

På venstre side av figur 15 vises det bindingssetet av 4YAY-basert modell på overflaten av reseptor modellen. Som vist på figuren er alle 15 agonister dokket i antatt bindingssetet. På høyre side av figur 15 vises det elektrostatisk potensialet av 4YAY-basert modell med de 15 agonister i antatt bindingssetet. figuren viser bindingslommen formet på overflaten av reseptormodellen med agonister inni. Det er mest elektronegativt rundt bindingssetet.



Figur 16 Forbindelse nr. 149 hadde den laveste score verdien av de 15 dokkede agonister.

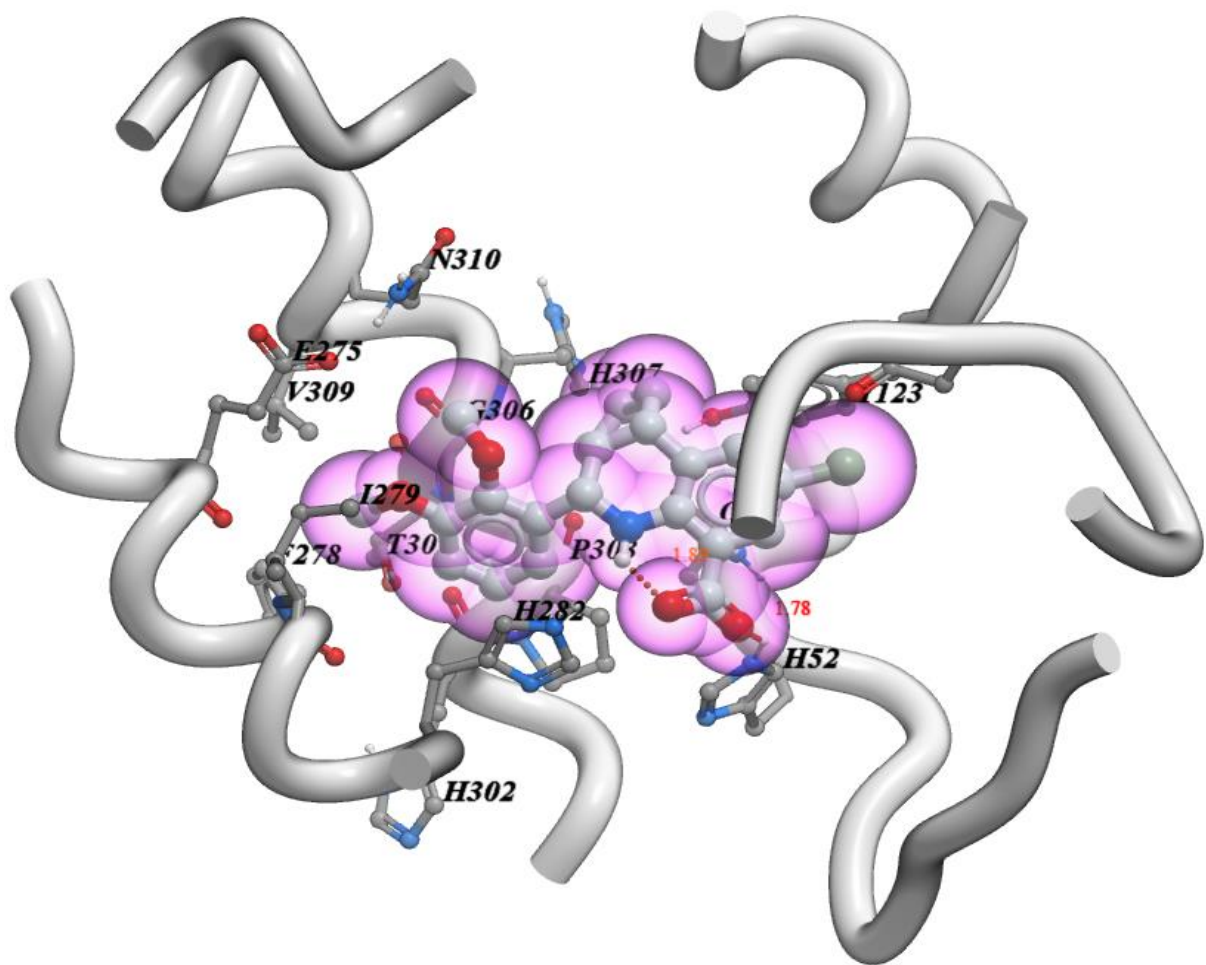
Figur 16 viser forbindelse nr. 149 som hadde den laveste score verdien på -21,58 av de 15 agonister som ble dokket i 4YAY-basert modellen. Denne forbindelsen var en aktiv forbindelse til GPER og fikk PUBCHEM aktivitets score på 100 %. Denne forbindelsen ble dermed brukt videre til å analysere bindingssetet i 4YAY-basert modellen og bindingsinteraksjonen mellom 4YAY-basert modell og forbindelse nr. 149.



Figur 17 2D ligandinteraksjons diagram for forbindelse 149. Grønn skygge indikerte hydrofob område, blå skygge indikerte hydrogenbindings akseptor, hvit pile indikerte hydrogenbinding, grå parabler indikerte tilgjengelig overflate, tykk linje rundt liganden indikerte tilgjengelig overflate. Avstanden mellom aminosyren og ligand indikerte avstanden.

Forbindelse 149 hadde to benzen ringer som forventes til å interagere med Tyr123 (TM2) og Phe278 (TM6) gjennom stacking interaksjon. Det ble observert hydrogenbinding mellom forbindelse nr. 149 og His52 (TM1) med en avstand på 1,78 Å (Figur 17). Det er også mulig at det blir dannet hydrogenbindinger med Gln53 (TM1), His282 (TM6), His302, His307 og Asn310 (TM7).

Forbindelsen kan også danne hydrofobiske interaksjoner med Glu275, Ile279 (TM6), Pro303, Gly306 og Val309 (TM7). Forbindelse nr. 149 har også en brom gruppe. Brom vil mest sannsynlig danne en elektrostatiske interaksjon med Asp202 (TM4). Slike interaksjoner er ikke stillestående som vist, det er bevegelse og fleksibilitet mellom molekylar. Denne fleksibiliteten gjør det lettere for forbindelsene å interagere med aminosyrer i bindingssetet. Figurene 17 og 18 er bare en øyeblikksbilde som viser hvordan forbindelse nr. 149 kan interagere.



Figur 18 Antatt bindingsinteraksjon mellom forbindelse nr. 149 og GPER.

Figur 18 viser antatt bindingsinteraksjon mellom forbindelse nr. 149 og 4YAY-basert modellen. På figuren ser vi tydelig hydrogenbindingen som ICM hadde foreslått med His52 (TM1), men vi ser også en annen foreslått hydrogenbinding. Denne hydrogenbindingen var mellom oksygen og hydrogenet som satt på nitrogen i liganden med en avstand på 1,89 Å. Hydrogenet som satt på nitrogen fungerte som hydrogenbindings donor og oksygenet fungerte som en hydrogenbindings akseptor. Bindingen som de hadde dannet kalles hydrogenbinding, og det oppstår mellom elektronegative atomer (oksygen i dette tilfellet) og et hydrogenatom (Figur 18).

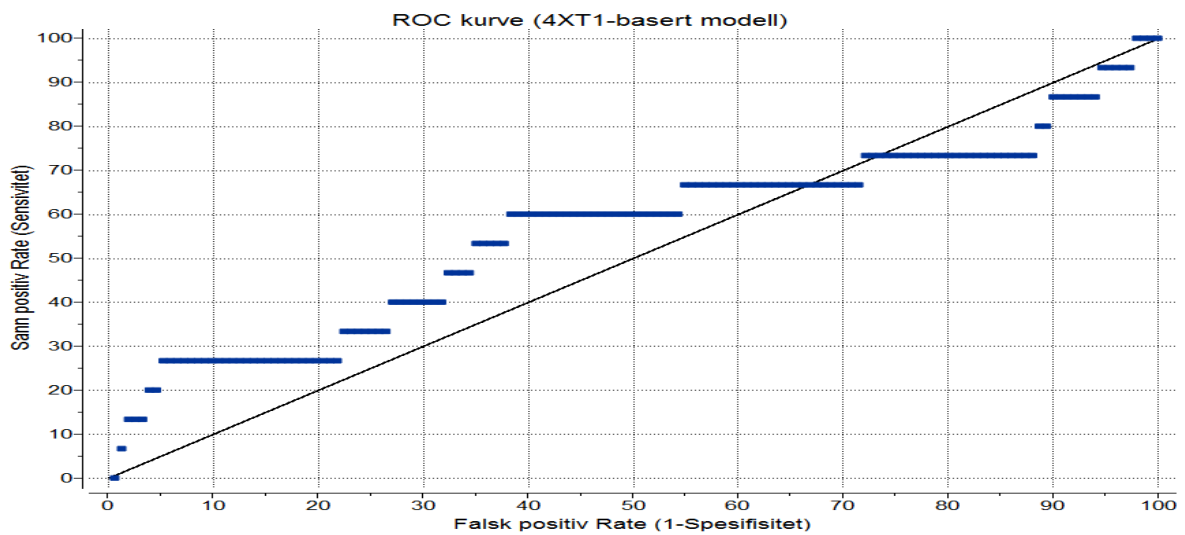
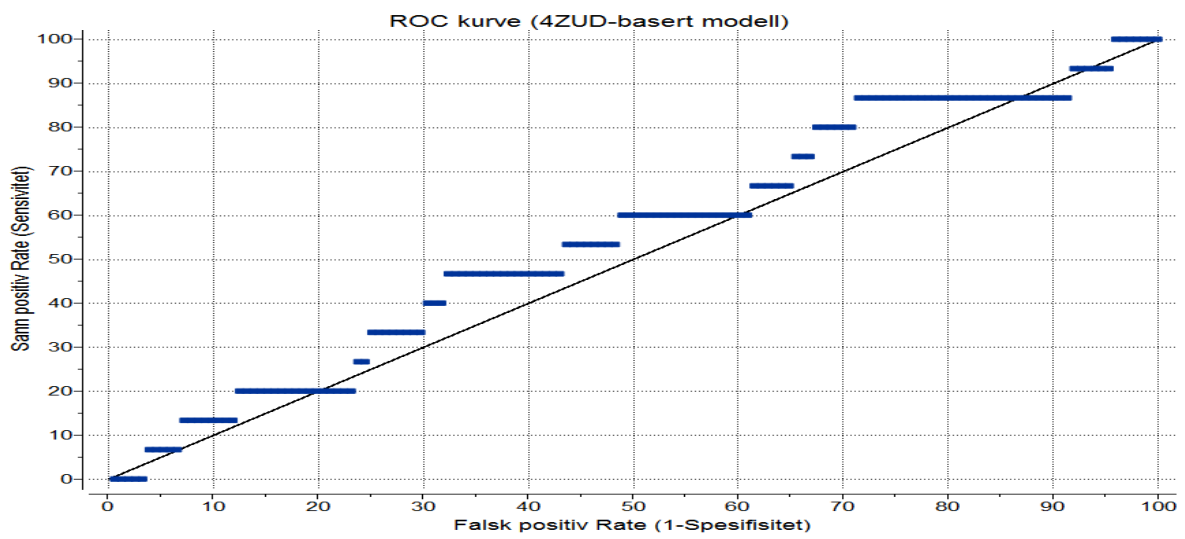
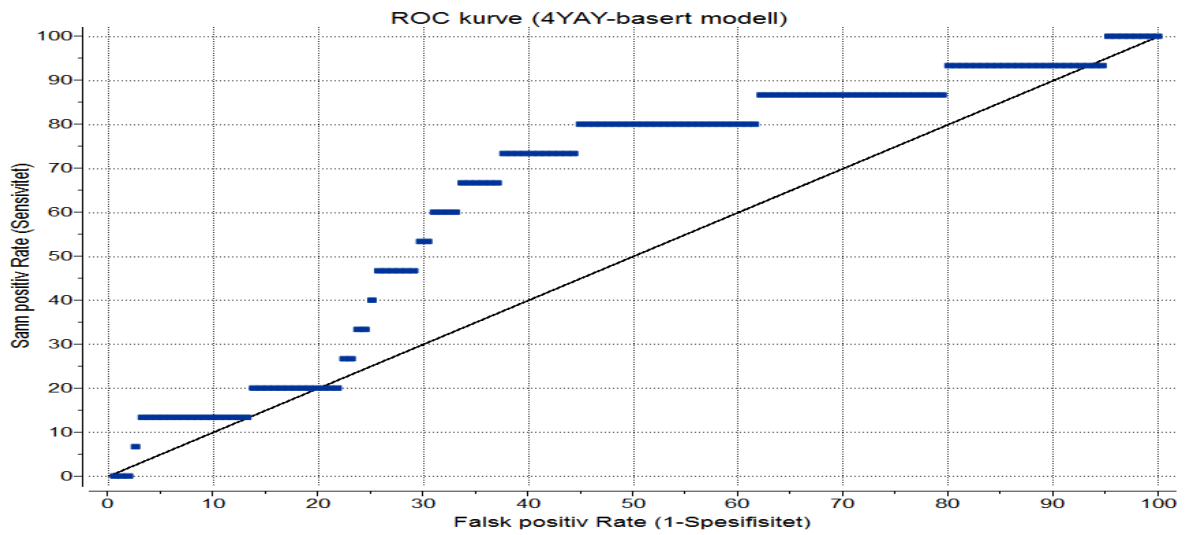
Aminosyrer i bindingssetet som kan være viktig for agonist binding var Tyr123 (TM2), Glu275, Phe278 (TM6) og Asn310 (TM7). De aminosyrene som har blitt foreslått i denne studien til å være viktige er også involvert i interaksjoner i andre GPER studier. I disse studiene har Tyr123 (TM2) vært involvert i stacking interaksjon og hydrogenbinding

interaksjon, Glu275 (TM6) har vært involvert i hydrogenbinding interaksjon, Phe278 (TM6) har vært involvert i stacking interaksjon og hydrogenbinding interaksjon og Asn310 (TM7) har vært involvert i hydrogenbinding interaksjon. Disse studiene undersøkte interaksjonen mellom GPER og kjente agonister (47, 49).

Det fantes dessverre ingen mutagenese studier som kunne bekrefte at disse foreslåtte aminosyrene faktisk spiller en viktig rolle i GPER agonist binding. De foreslåtte aminosyrene i denne studien sammen med andre aminosyrer omkring antatt bindingssete av GPER modellen kan hjelpe med å velge aminosyrer for seterettet mutagenese studier. Hvis eksperimentelle mutagenese studier bekrefter disse aminosyrene til å være viktige, kan vi konkludere med at modellen er delvis korrekt og foreslåtte aminosyrer i denne studien er viktige.

GPCR eksisterer i likevekt mellom aktive og inaktive konformasjoner. Agonister kan utøve deres handling ved å stabilisere den aktive signal konformasjonen. Forskjellige agonister kan binde til aktiv konformasjon, men de trenger ikke til å binde til felles aminosyre for å kunne bruke deres aktivitet (48). Dette betyr at aminosyrer foreslått til å være viktige for GPER agonist aktivering i denne studien, kan være spesifikk for agonister som har lik størrelse og kjemiske karakterer og ikke generell for GPER agonister. Ytterligere mutagenese studier med resultater presentert i denne studien kan hjelpe med å lede i riktig retning, men kun en røntgenkrystallografi struktur av GPER kan forklare mulig bindingsform.

ROC-kurver ble brukt til å evaluere modellenes evne til å skille mellom aktive og decoys forbindelser. Figur 19 viser ROC-kurver av alle de tre modellene som ble bygd i denne studien. 4YAY-basert modell var den modellen som hadde en ROC-kurve lengst unna den diagonale linjen og hadde høyeste AUC-verdi på 0,65. Med en AUC-verdi på 0,65 kan man si at modellen var rimelig bra til å skille mellom aktive og decoys forbindelser. 4ZUD-basert modellen var ganske nært den diagonale linjen og hadde en AUC-verdi på 0,55. 4XT1-basert modellen krysset den diagonale linjen, men AUC-verdien var ikke så langt unna 4ZUD-basert modellen. Den hadde en AUC-verdi på 0,56. Vi kan konkludere med at 4YAY-basert modellen hadde den beste evnen til å skille mellom aktive og decoys forbindelsene sammenlignet med 4ZUD- og 4XT1- baserte modellene. Derfor ble denne modellen brukt videre til VLS.



Figur 19 ROC-kurve av 4YAY-basert modell (øverst), 4ZUD-basert modell (midten) og 4XT1-basert modell (nederst).

4.3 Virtuell ligand screening (VLS)

Forbindelse nr. 149 var den som hadde lavest score verdi av agonister som ble dokket. Denne forbindelsen ble brukt som en ligandkandidat til å søke etter potensielle forbindelser som kunne brukes som legemidler. Fra screening ble det totalt funnet 3544 forbindelser med en strukturlikhet på 50% med forbindelse nr. 149. Disse 3544 forbindelsene ble dokket i 4YAY-basert modellen. Fra dokkingen hadde totalt 66 forbindelser score verdi fra -24 og bedre, med den beste score verdien på -27,99.

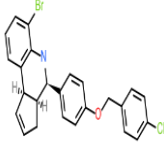
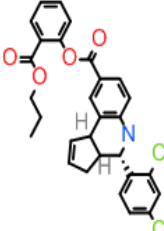
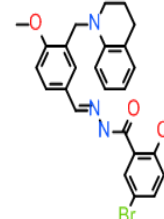
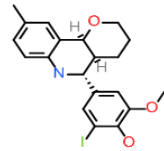
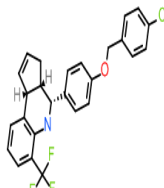
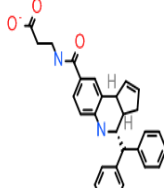
Forbindelsene hadde interaksjon med aminosyrer på overflaten av antatt bindingssetet av 4YAY-basert modellen, samme sted som de kjente agonister hadde interaksjoner. De fleste aromatrिंगene i forbindelsene kunne danne interaksjon med Tyr123 og Phe278 gjennom stacking interaksjon. Forbindelsene kunne også danne hydrogenbindinger med nabo aminosyrer som hadde elektornegative atomer.

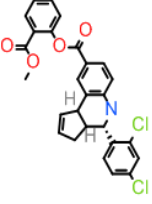
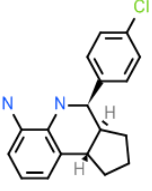
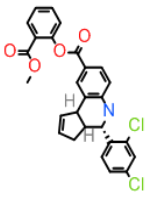
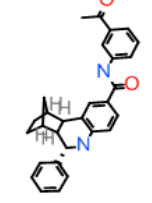
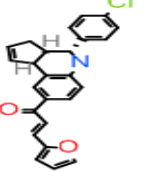
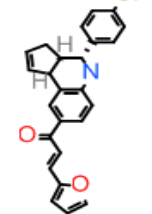
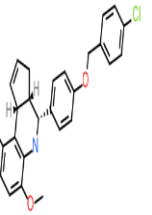
Resultater oppnådd fra VLS ble sortert basert på deres score verdi, fysikalsk-kjemiske og drug-like egenskaper. Det ble totalt valgt ut 20 forbindelser som er vist i tabell 5. Forbindelser med høyest score verdi trenger ikke å ha høy affinitet, og det er ingen garanti for at disse forbindelsene vil binde til GPER når de blir testet eksperimentelt. Å kun fokusere på ligander med best score verdi kan føre til at ligander som er orientert i en stilling med dårligere score verdi blir oversett. Denne metoden er kun ment som veiledning til å finne rasjonelle forbindelser for *in vitro* testing.

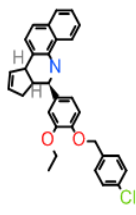
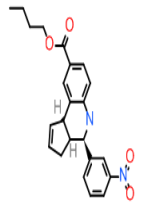
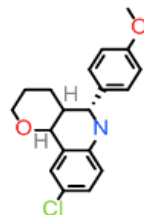
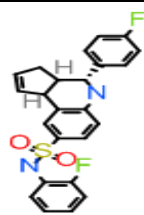
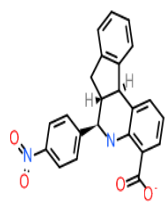
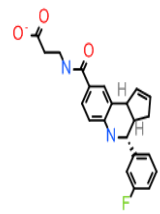
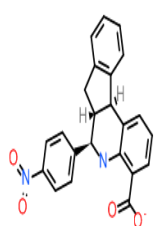
Det er flere momenter som er avgjørende for drug-like egenskaper; størrelse (MW/antall heavy atoms (HA)), hydrofobitet (LogP), antall hydrogenbindings akseptor (HBA), antall hydrogenbindings donor (HBD), polart overflateareal (PSA) og antall roterbare bindinger (RB). 25-30 HA (molekylvekt på 500 gir ca. 36 HA) gir best affinitet, mindre og større enn det gir dårligere affinitet. En forbindelse har negativ LogP når det er mer vannløselig enn fettløselig. HBA er summen av antall oksygen og nitrogen atomer i forbindelsen. HBD er summen av antall hydrogen atomer som er bundet til oksygen og nitrogen atomer i forbindelsen. Molekyler med mange roterbare bindinger vil gi et stort antall konformasjoner (3^n , n står for antall RB). Fysikalsk-kjemiske egenskaper er avgjørende for forbindelsens affinitet. Bortsett fra disse er det også nødvendig å unngå uønskede kjemiske egenskaper;

reaktive, ustabile og toksiske funksjonelle grupper. Dette kan for eksempel være aldehyder, nitrogrupper og peroksider.

Tabell 5 Forslag til GPER agonister valgt ut fra virtuell ligand screening.

Struktur	Molekyl formel	Score	LogP	PSA	HBA	HBD	RB	Molekyl-vekt	Druglikeness
	C ₂₅ H ₂₁ BrClNO	-27,99	8,19	17,30	1	1	4	465,05	0,32
	C ₂₉ H ₂₅ Cl ₂ NO ₄	-27,72	8,65	53,83	6	1	8	521,12	1,51
	C ₂₅ H ₂₄ BrN ₃ O ₃	-27,31	5,67	62,30	5	2	5	493,10	1,52
	C ₂₀ H ₂₂ INO ₃	-27,02	4,86	43,94	3	2	2	451,06	0,57
	C ₂₆ H ₂₁ ClF ₃ NO	-26,82	8,57	17,30	1	1	5	455,13	0,25
	C ₂₉ H ₂₇ N ₂ O ₃	-26,66	5,43	64,96	6	2	8	451,20	0,92

	$C_{27}H_{21}Cl_2NO_4$	-26,59	7,69	53,96	6	1	6	493,08	1,31
	$C_{18}H_{19}ClN_2$	-26,57	4,97	30,17	0	3	1	298,12	0,68
	$C_{27}H_{21}Cl_2NO_4$	-26,42	7,69	53,96	6	1	6	493,08	1,31
	$C_{29}H_{28}N_2O_2$	-26,33	5,88	49,53	4	2	5	436,22	1,01
	$C_{25}H_{20}ClNO_2$	-25,95	7,00	33,05	3	1	4	401,12	0,75
	$C_{25}H_{20}ClNO_2$	-25,46	7,0	33,05	3	1	4	401,12	0,75
	$C_{26}H_{23}Cl_2NO_2$	-25,44	8,02	24,93	2	1	5	451,11	0,63

	$C_{31}H_{28}ClNO_2$	-25,33	9,23	24,32	2	1	6	481,18	0,35
	$C_{23}H_{24}N_2O_4$	-25,20	6,20	66,75	7	1	7	392,17	0,39
	$C_{19}H_{20}ClNO_2$	-25,19	4,88	28,37	2	1	2	329,12	0,88
	$C_{24}H_{20}F_2N_2O_2S$	-25,01	6,16	52,27	4	2	4	438,12	0,29
	$C_{23}H_{17}N_2O_4$	-24,99	5,31	71,59	8	1	3	385,12	0,37
	$C_{22}H_{20}FN_2O_3$	-24,94	4,23	65,23	6	2	6	379,15	0,86
	$C_{23}H_{17}N_2O_4$	-24,92	5,31	71,59	8	1	3	385,12	0,37

Studier har vist at GPER agonister kan representere en ny terapeutisk metode for slag, kronisk neurodegenerasjons sykdommer, anvendelse i kroniske inflammatoriske sykdommer, behandling av vaskulær og myokard sykdommer hos både menn og kvinner, renobeskyttende rolle i hypertensive nefropati og spille en rolle i benmetabolismen (50). Forbindelsene som ble foreslåtte her fra VLS må først gjennom flere stadier for å kunne bli brukt som legemidler, men hvis de kommer seg gjennom stadiene kan de bli brukt til disse foreslåtte terapeutiske metodene.

En gjentakende prosess mot en bedre forståelse av proteinstruktur og funksjonen av disse proteiner bidras til ved seterettet mutagenese studier og molekylmodellering. Dokking av legemiddelmolekyler inn i deres bindingssete og identifisere aminosyrer i modellen kan hjelpe i valg av aminosyrer for fremtidige seterettet mutagenese studier. En måte å anse at modeller er korrekte er hvis observasjoner av legemiddelbindings affinitet fra eksperimentelle studier er i samsvar med det som har blitt foreslått i denne modelleringsstudien. Hvis ikke må modellen justeres.

Vitenskap startes med en problem, og som løsning på problemet lages det hypoteser. Hypotesene blir deretter kritisert og testet. Hvis resultatet som er oppnådd ikke støtter hypotesen, må hypotesen justeres eller elimineres. Hvis hypotesen er riktig, må den bli et verktøy for enda strengere kritikk og testing. Den vitenskapelige problemet i denne studien er GPER 3D strukturen. En molekylmodell av GPER er konstruert som en hypotese. Ligander legges i antatt bindingssete i modellen, og prediksjoner trekkes fra hypotesen ved å foreslå aminosyrer som kan være involvert i ligandbindingen. Deretter blir hypotesen testet eksperimentelt ved å ta enkelt-punkt mutasjoner i GPER og teste ligandbindings affiniteter.

5 Feilkilder

Det er flere begrensninger assosiert med modellene presentert i denne studien. Kvaliteten av modellene er avhengig av kvaliteten av krystallstrukturene til templatene. Feil i krystallstruktur er undertrykt i modellen. Når sekvenslikheten faller under 35%, øker sjansene for feil i alignment. Feil i sekvensalignment resulterer til feil i posisjonering av aminosyrer på templatet, det vil si feil i 3D modellen. Når target-templat likheten øker, øker også kvaliteten av modellen. Tomrom i sekvensalignment kan gi feil i modellen. Tomrom er tilstede i sekvensalignment for å optimalisere alignmentet.

Homologimodellering i kombinasjon med eksperimentell data på GPER øker styrken av resultater. Det er ingen tilgjengelige eksperimentelle data på GPER og derfor er resultater presentert i denne studien begrenset. Modellene må testes eksperimentelt og omjustert hvis nødvendig.

Bindingssetet til GPER er ikke kjent og derfor har i denne studien blitt brukt templater til å foreslå bindingssetet. Det kan hende at bindingssetet valgt i denne studien ikke stemmer når det blir testet eksperimentelt. Viktige aminosyrer foreslått i denne studien er viktige for interaksjoner med agonister brukt i denne studien. Andre agonister dokket i den modellen kan gi andre resultater.

Svakheter med denne modellen er at den er stillestående og er et øyeblikksbilde av target, mens i virkeligheten er både liganden og target fleksible strukturer og kan forandre konformasjon ved interaksjon med liganden. I denne studien er det ikke tatt hensyn til dynamiske forandringer, loop bevegelse, allosterisk interaksjoner, membran miljø, løsningsmidler og andre parameterer inverterende i levende celler. Når disse ikke har blitt tatt hensyn til, kan vi ikke garantere slik binding når de blir testet eksperimentelt.

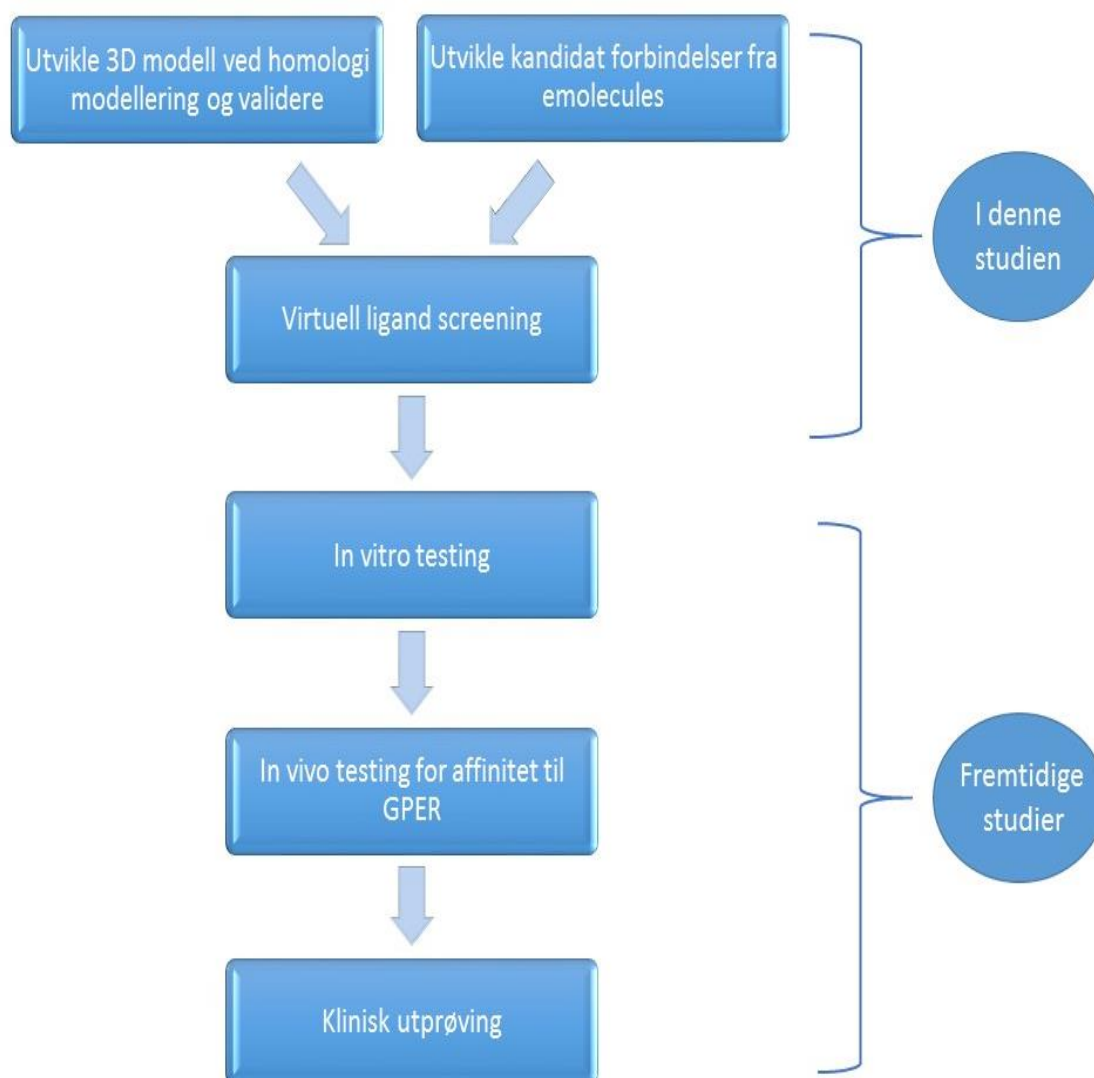
Alt i alt er modellene presentert i denne studien brukelig som verktøy for eksperimentelle studier som en mutagenese studie. Per dags dato er det den eneste muligheten for å studere ligand-target interaksjon mens vi venter på en krystallstruktur av GPER.

6 Konklusjon

Tre GPER modeller ble bygd for å studere molekylære interaksjoner av GPER. Modellene som ble bygd var av høy kvalitet for å kunne bli brukt i dokkingsstudier. Av tre modeller som ble bygd, var 4YAY-basert modellen den beste av de tre til å skille mellom agonister og decoys forbindelser. Denne modellen kan da bli brukt som et verktøy for eksperimentelle studier. Homologimodellen som ble bygd gav oss muligheten til å forutsi aminosyrer fra antatt GPER bindingssetet. Disse aminosyrene kan være involvert i agonist bindings interaksjoner og kan bli gode kandidater for seterettet mutagenese studier. Fra VLS fullført på 4YAY-basert modellen, ble 20 forbindelser valgt for fremtidig *in vitro* testing. Interaksjoner og karakteristiske trekk involvert av GPER agonist binding er fortsatt uklar på grunn av mangel på eksperimentelle data. Det er utfordrende å bruke homologimodell til å kartlegge bindings interaksjoner av kjente GPER agonister, og i tillegg uten seterettet mutagenese studier.

7 Fremtidsperspektiv

Modeller presentert i denne studien betraktes hovedsakelig som arbeidsverktøy for generering av hypotese og designing av eksperimentelle studier relatert til GPER. Oppdagelse og utvikling av nye legemidler er en lang prosess (Figur 20). Det som ble gjort i denne studien er bare det som skjer i første stadiet. 20 forbindelser har blitt foreslått som potensielle legemiddelkandidater for GPER. Disse forbindelsene må bli testet *in vitro* for å finne ut om deres affinitet til GPER. Hvis disse forbindelsene bindes slik det har blitt foreslått i denne studien, kan de bli videre optimalisert og brukt til *in vivo* GPER affinitets testing. Molekyler som eventuelt kommer seg gjennom disse stadier kan bli brukt som potensielle legemiddelkandidater.



Figur 20 Illustrasjon av fremtidige studier. Viser det som har blitt gjort i denne studien og hva som må gjøres i fremtidige studier.

Litteraturreferanser

1. Nussey SS, Whitehead SA. Endocrinology: An Integrated Approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22/>.
2. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Toverud KC. Menneskets fysiologi. 2th ed. Oslo: Gyldendal akademisk; 2014. 872 p.
3. Kleine B, Rossmanith WG. Hormones and the Endocrine System: Textbook of Endocrinology: Springer International Publishing; 2016. Available from: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-15060-4/page/1>.
4. Melmed S, Conn PM. Endocrinology: Basic and Clinical Principles: Humana Press; 2007. Available from: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-1-59259-829-8/page/1>.
5. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. Annual review of physiology. 2008;70:165-90.
6. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. The New England journal of medicine. 2002;346(5):340-52.
7. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. Physiological reviews. 2007;87(3):905-31.
8. Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. Trends in molecular medicine. 2013;19(3):197-209.
9. Kazmi N, Márquez-Garbán DC, Aivazyán L, Hamilton N, Garon EB, Goodglick L, et al. The role of estrogen, progesterone and aromatase in human non-small-cell lung cancer. Lung cancer management. 2012;1(4):259-72.

10. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology. 7th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2012. 777 p.
11. Bernard JP, Opdal MS, Khiabani H. Generelle farmakodynamiske prinsipper. Tidsskriftet Den Norske Legeforening nr 16. 2006;126:2107-9.
12. Ardala Breda NFV, Osmar Norberto de Souza, and Richard Charles Garratt. Protein Structure, Modelling and Applications. 01.mai.2006. In: Bioinformatics in Tropical Disease Research: A Practical and Case-Study Approach [Internet] [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6824/>.
13. Lee SM, Booe JM, Pioszak AA. Structural insights into ligand recognition and selectivity for classes A, B, and C GPCRs. European journal of pharmacology. 2015;763(Pt B):196-205.
14. Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. Annual review of pharmacology and toxicology. 2013;53:531-56.
15. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Molecular pharmacology. 2003;63(6):1256-72.
16. Kristiansen K. Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function. Pharmacology & therapeutics. 2004;103(1):21-80.
17. Kim MJ, Kim TH, Lee HH. G-protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) and Women's Health. Journal of Menopausal Medicine. 2015;21(2):79-81.
18. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. Nature reviews Endocrinology. 2011;7(12):715-26.

19. Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2009. 752 p.
20. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chemical reviews*. 2006;106(5):1589-615.
21. Vyas VK, Ukawala RD, Ghate M, Chinthala C. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;74(1):1-17.
22. Orry AJW, Abagyan R, editors. *Homology Modeling: Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2012. 419 p.
23. Höltje HD, Sippl W, Rognan D, Folkers G. *Molecular Modeling*. 3th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2008. 320 p.
24. Ravna AW, Sylte I. Homology modeling of transporter proteins (carriers and ion channels). *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2012;857:281-99.
25. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2004;3(11):935-49.
26. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian Journal of Internal Medicine*. 2013;4(2):627-35.
27. Klebe G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug discovery today*. 2006;11(13-14):580-94.
28. Neves MAC, Totrov M, Abagyan R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2012;26(6):675-86.

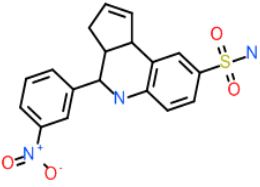
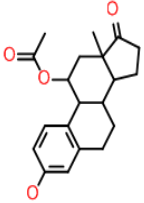
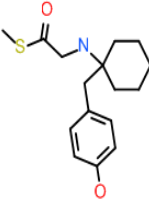
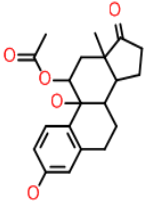
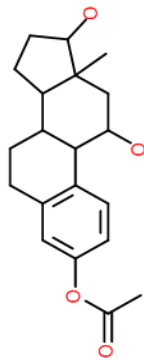
29. Abagyan R, Totrov M, Kuznetsov D. ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*. 1994;15(5):488-506.
30. Parasuraman S. Protein data bank. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 2012;3(4):351-2.
31. Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bairoch A. UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2007;406:89-112.
32. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Research*. 2012;40(Database issue):D1100-D7.
33. Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP, et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their ligands. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D1098-106.
34. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(Database issue):D1202-D13.
35. Ballesteros JA, Shi L, Javitch JA. Structural mimicry in G protein-coupled receptors: implications of the high-resolution structure of rhodopsin for structure-function analysis of rhodopsin-like receptors. *Molecular pharmacology*. 2001;60(1):1-19.
36. Zhang H, Unal H, Gati C, Han GW, Liu W, Zatspein NA, et al. Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell*. 2015;161(4):833-44.
37. Zhang H, Unal H, Desnoyer R, Han GW, Patel N, Katritch V, et al. Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(49):29127-39.

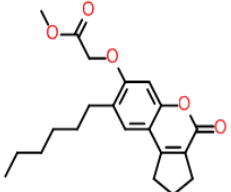
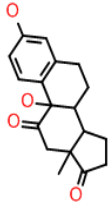
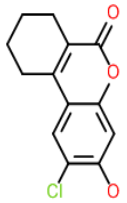
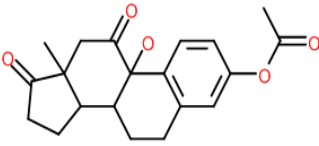
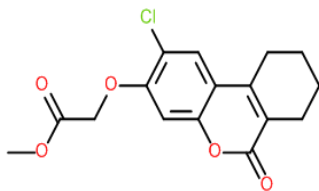
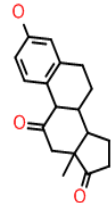
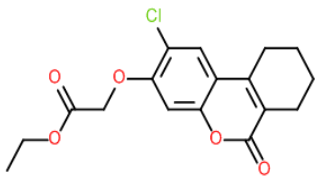
38. Burg JS, Ingram JR, Venkatakrishnan AJ, Jude KM, Dukkipati A, Feinberg EN, et al. Structural biology. Structural basis for chemokine recognition and activation of a viral G protein-coupled receptor. *Science (New York, NY)*. 2015;347(6226):1113-7.
39. Abagyan R, Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *Journal of molecular biology*. 1994;235(3):983-1002.
40. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. 1993;26(2):283-91.
41. Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE. Errors in protein structures. *Nature*. 1996;381(6580):272.
42. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1993;2(9):1511-9.
43. Sager G, Orvoll EO, Lysaa RA, Kufareva I, Abagyan R, Ravna AW. Novel cGMP efflux inhibitors identified by virtual ligand screening (VLS) and confirmed by experimental studies. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(7):3049-57.
44. Worth CL, Kleinau G, Krause G. Comparative sequence and structural analyses of G-protein-coupled receptor crystal structures and implications for molecular models. *PloS one*. 2009;4(9):e7011.
45. Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*. 1992;12(4):345-64.
46. Xie ZR, Hwang MJ. Methods for predicting protein-ligand binding sites. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1215:383-98.

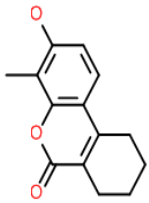
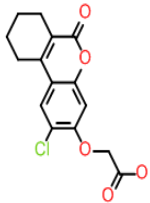
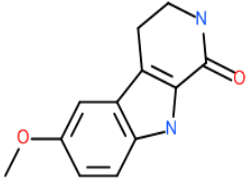
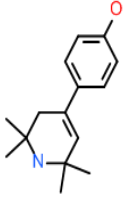
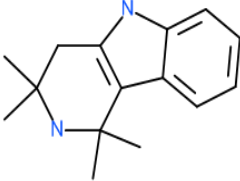
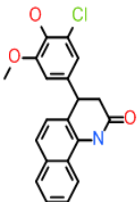
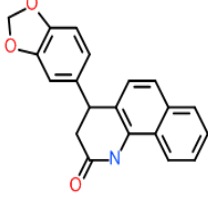
47. Arnatt CK, Zhang Y. G Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Agonist Dual Binding Mode Analyses toward Understanding of its Activation Mechanism: A Comparative Homology Modeling Approach. *Molecular informatics*. 2013;32(7):647-58.
48. Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE. Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2006;46:481-519.
49. Mendez-Luna D, Martinez-Archundia M, Maroun RC, Ceballos-Reyes G, Fragoso-Vazquez MJ, Gonzalez-Juarez DE, et al. Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2015;33(10):2161-72.
50. Prossnitz ER, Barton M. The G protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(12):715-26.

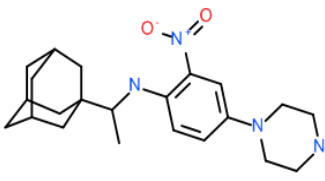
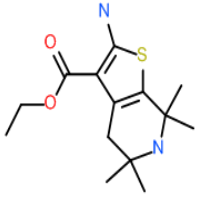
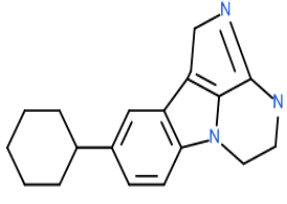
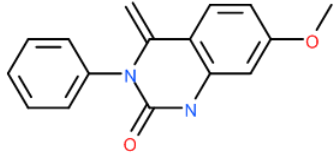
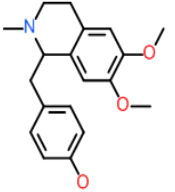
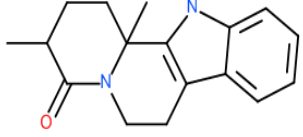
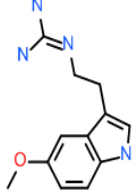
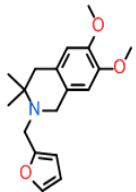
Appendiks

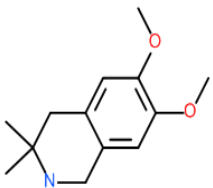
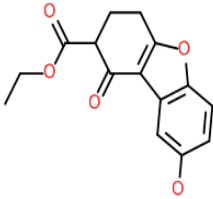
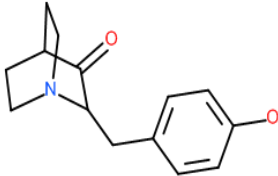
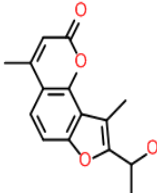
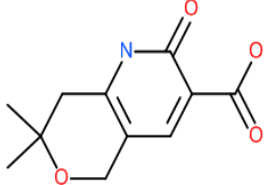
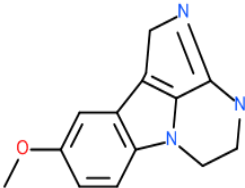
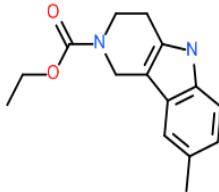
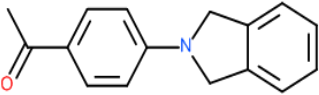
A.1 Aktive og inaktive forbindelser generert fra PUBCHEM.

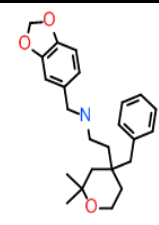
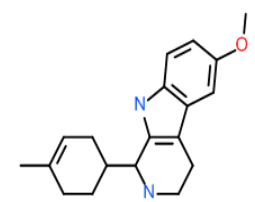
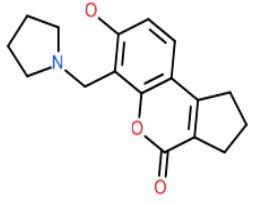
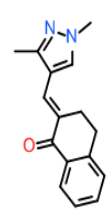
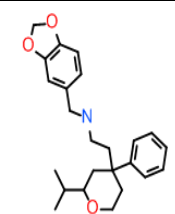
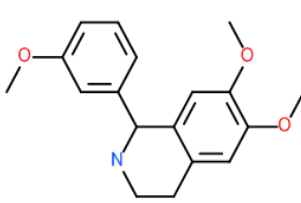
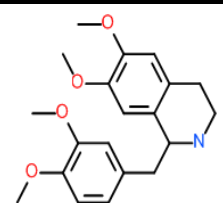
Forbindelse	PUBCHEM SID	PUBCHEM CID	PUBCHEM aktivitets resultat	PUBCHEM aktivitet score	Molekylstruktur
1	48409451	3141780	Inaktiv	0	
2	48409452	3245620	Inaktiv	0	
3	48409453	4178068	Inaktiv	0	
4	48409454	4444275	Inaktiv	0	
5	48409455	5195886	Inaktiv	0	

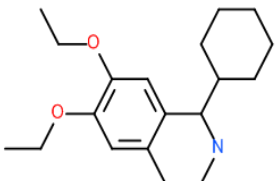
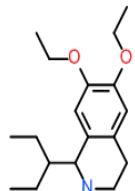
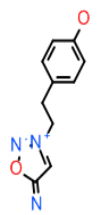
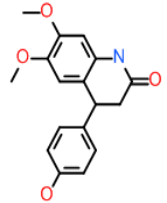
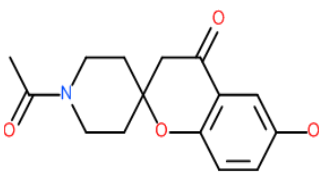
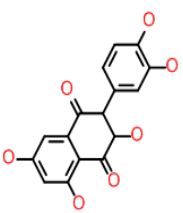
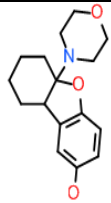
6	48409456	2325247	Inaktiv	0	
7	48409457	3252214	Inaktiv	0	
8	48409458	5322282	Inaktiv	0	
9	48409459	4614142	Inaktiv	0	
10	48409460	678607	Inaktiv	0	
11	48409461	589886	Inaktiv	0	
12	48409462	760205	Inaktiv	0	

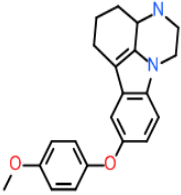
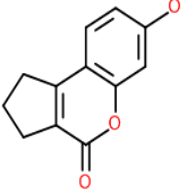
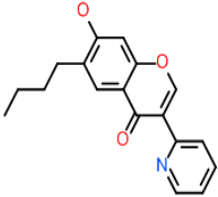
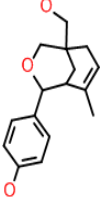
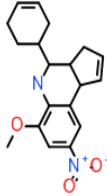
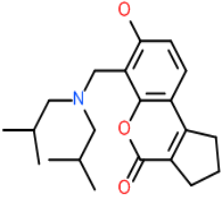
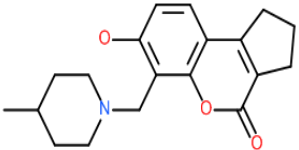
13	48409463	5322280	Inaktiv	0	
14	48409464	2055108	Inaktiv	0	
15	48409465	87372	Inaktiv	0	
16	48409466	612147	Inaktiv	0	
17	48409467	354526	Inaktiv	0	
18	48409468	2882925	Inaktiv	0	
19	48409469	2855879	Inaktiv	0	

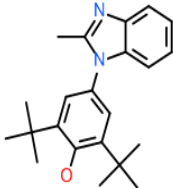
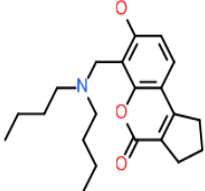
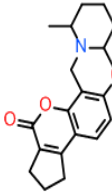
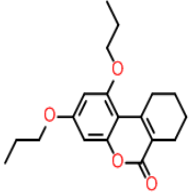
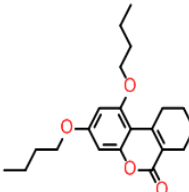
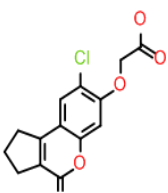
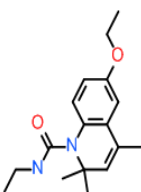
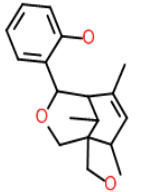
20	48409470	24048954	Inaktiv	0	
21	48409471	690195	Inaktiv	0	
22	48409472	755478	Inaktiv	0	
23	48409473	899337	Inaktiv	0	
24	48409474	98348	Inaktiv	0	
25	48409475	620161	Inaktiv	0	
26	48409476	4563078	Inaktiv	0	
27	48409477	4148138	Inaktiv	0	

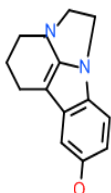
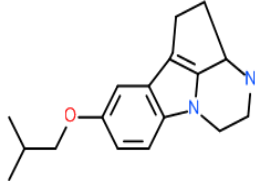
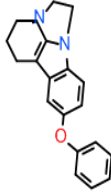
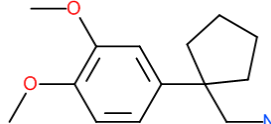
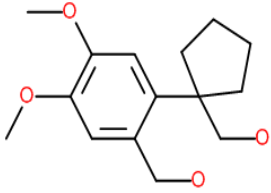
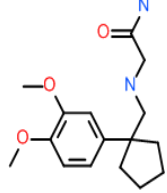
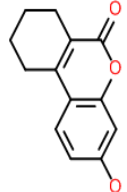
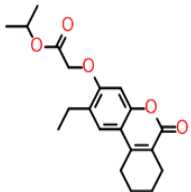
28	48409478	4339864	Inaktiv	0	
29	48409479	3700095	Inaktiv	0	
30	48409480	60526	Inaktiv	0	
31	48409481	618368	Inaktiv	0	
32	48409482	801145	Inaktiv	0	
33	48409483	3313295	Inaktiv	0	
34	48409484	2937007	Inaktiv	0	
35	48409485	839241	Inaktiv	0	

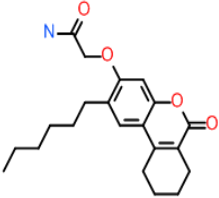
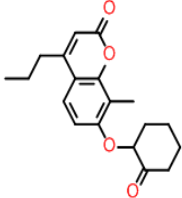
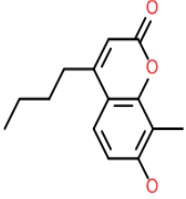
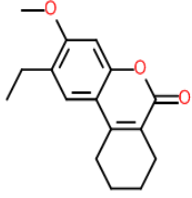
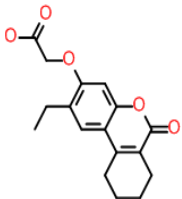
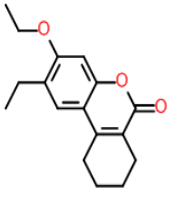
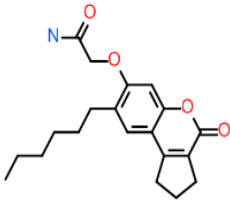
36	48409486	2921196	Inaktiv	0	
37	48409487	3154499	Inaktiv	0	
38	48409488	5397111	Inaktiv	0	
39	48409489	756799	Inaktiv	0	
40	48409490	2946035	Inaktiv	0	
41	48409491	2828702	Inaktiv	0	
42	48409492	5418	Inaktiv	0	

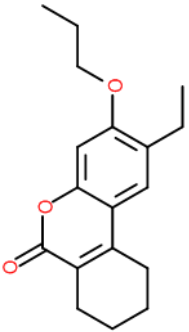
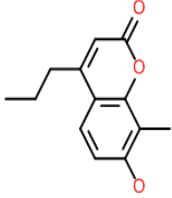
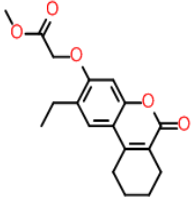
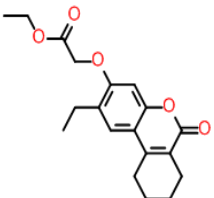
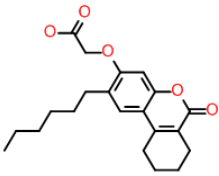
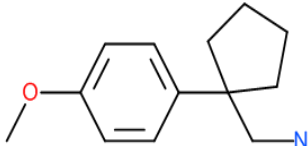
43	48409493	3303402	Inaktiv	0	
44	48409494	3588603	Inaktiv	0	
45	48409495	3631841	Inaktiv	0	
46	48409496	17379998	Inaktiv	0	
47	48409497	5129668	Inaktiv	0	
48	48409498	3591732	Inaktiv	0	
49	48409499	3765232	Inaktiv	0	

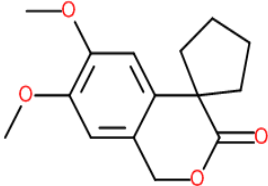
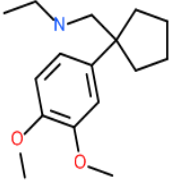
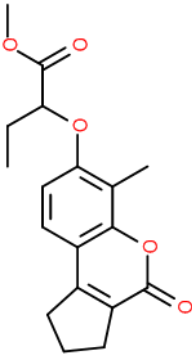
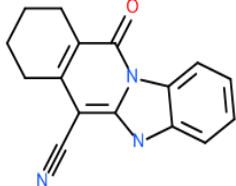
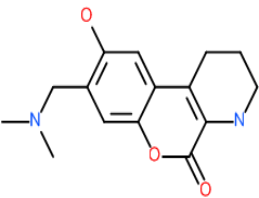
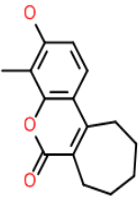
50	48409500	3793259	Inaktiv	0	
51	48409501	5322196	Inaktiv	0	
52	48409502	5322202	Inaktiv	0	
53	48409503	2828563	Inaktiv	0	
54	48409504	2868331	Inaktiv	0	
55	48409505	5322221	Inaktiv	0	
56	48409506	5322240	Inaktiv	0	

57	48409507	3124253	Inaktiv	0	
58	48409508	5322224	Inaktiv	0	
59	48409509	5322226	Inaktiv	0	
60	48409510	3121221	Inaktiv	0	
61	48409511	3121222	Inaktiv	0	
62	48409512	1900267	Inaktiv	0	
63	48409513	737989	Inaktiv	0	
64	48409514	2847821	Inaktiv	0	

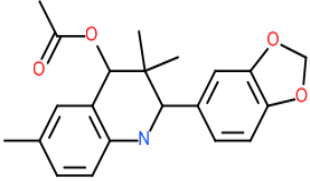
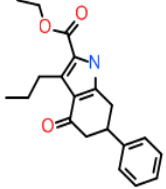
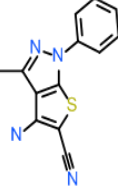
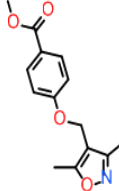
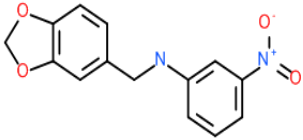
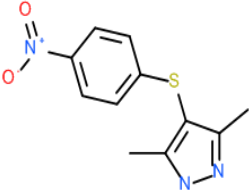
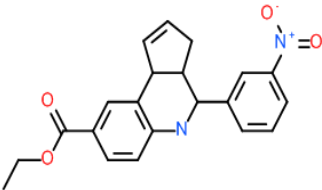
65	48409515	608195	Inaktiv	0	
66	48409516	620743	Inaktiv	0	
67	48409517	2829440	Inaktiv	0	
68	48409518	739193	Inaktiv	0	
69	48409519	739188	Inaktiv	0	
70	48409520	609631	Inaktiv	0	
71	48409521	5322315	Inaktiv	0	
72	48409522	2055536	Inaktiv	0	

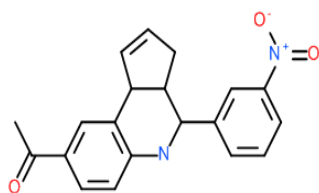
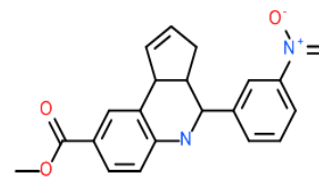
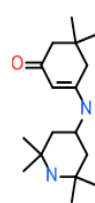
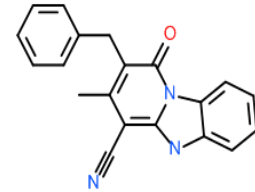
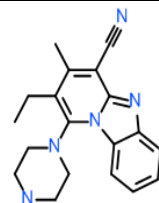
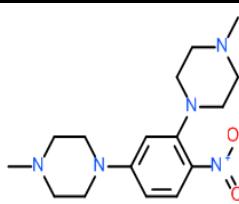
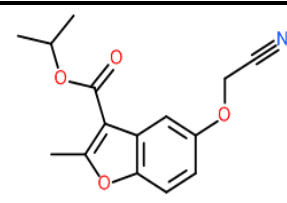
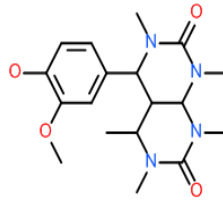
73	48409523	4915003	Inaktiv	0	
74	48409524	2902268	Inaktiv	0	
75	48409525	5322321	Inaktiv	0	
76	48409526	2055532	Inaktiv	0	
77	48409527	3145515	Inaktiv	0	
78	48409528	2055535	Inaktiv	0	
79	48409529	1899937	Inaktiv	0	

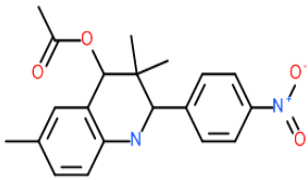
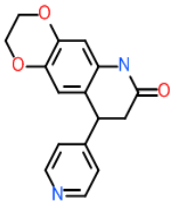
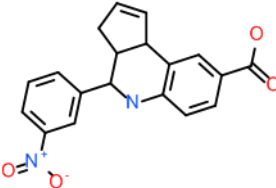
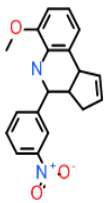
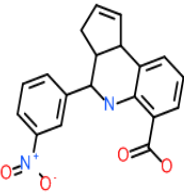
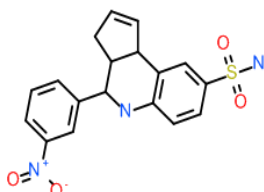
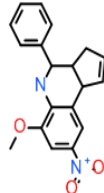
80	48409530	1637013	Inaktiv	0	
81	48409531	5322323	Inaktiv	0	
82	48409532	3145514	Inaktiv	0	
83	48409533	4135689	Inaktiv	0	
84	48409534	2352115	Inaktiv	0	
85	48409535	745023	Inaktiv	0	

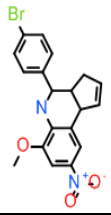
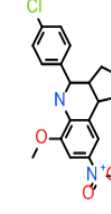
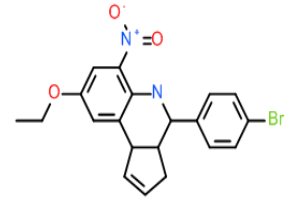
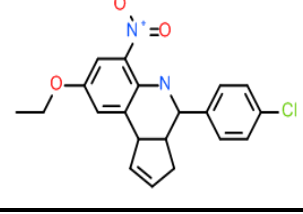
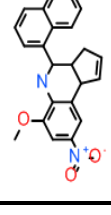
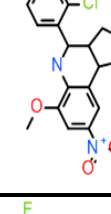
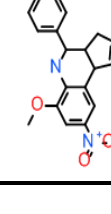
86	48409536	749856	Inaktiv	0	
87	48409537	650062	Inaktiv	0	
88	48409538	2791936	Inaktiv	0	
89	48409539	356284	Inaktiv	0	
90	48409540	750076	Inaktiv	0	
91	48409541	5322386	Inaktiv	0	

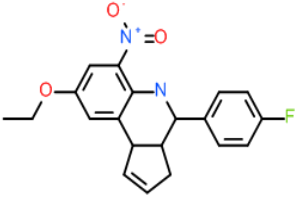
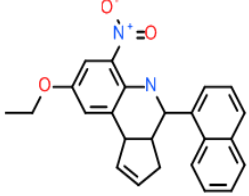
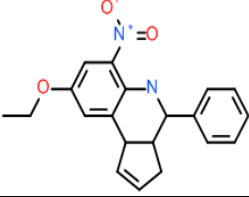
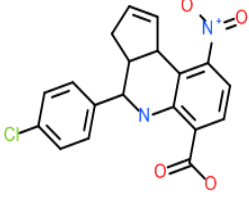
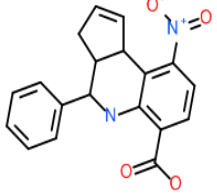
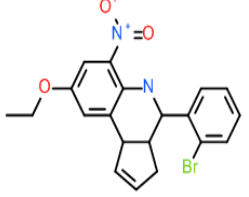
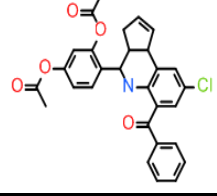
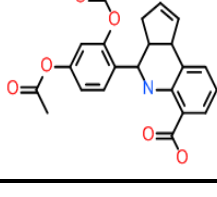
92	48409542	5322399	Aktiv	100	
93	48409543	3554089	Inaktiv	0	
94	48409544	4543416	Inaktiv	0	
95	48409545	3939416	Inaktiv	0	
96	48409546	5322418	Aktiv	100	
97	48409547	214806	Inaktiv	0	
98	48409548	4054685	Inaktiv	0	

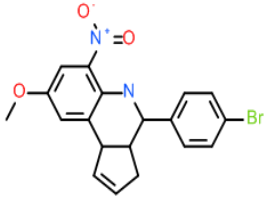
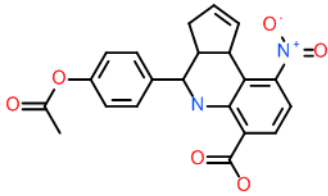
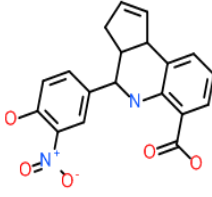
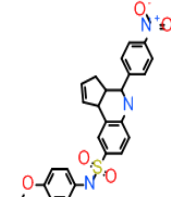
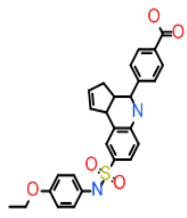
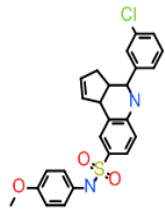
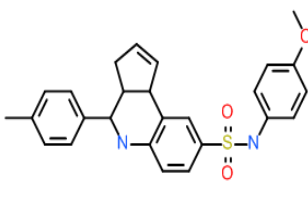
99	48409549	3557713	Inaktiv	0	
100	48409550	2974076	Inaktiv	0	
101	48409551	4301366	Inaktiv	0	
102	48409552	704164	Aktiv	35	
103	48409553	682326	Inaktiv	0	
104	48409554	723032	Inaktiv	0	
105	48409555	2854188	Inaktiv	0	

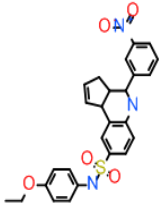
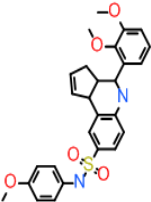
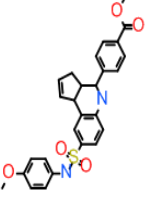
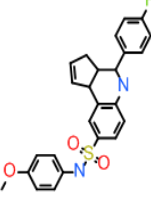
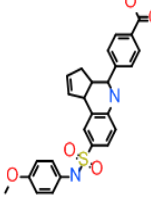
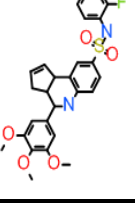
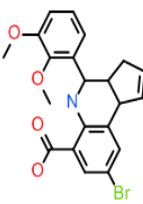
106	48409556	2865996	Aktiv	40	
107	48409557	2868387	Inaktiv	0	
108	48409558	777398	Inaktiv	0	
109	48409559	708445	Inaktiv	0	
110	48409560	629205	Inaktiv	0	
111	48409561	2888142	Inaktiv	0	
112	48409562	1904057	Inaktiv	0	
113	48409563	652956	Inaktiv	0	

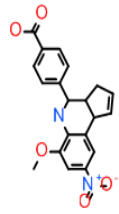
114	48409564	2942165	Inaktiv	0	
115	48409565	2983583	Inaktiv	0	
116	48409566	2771382	Inaktiv	0	
117	48409567	2847122	Inaktiv	0	
118	48409568	2854262	Aktiv	100	
119	48409569	2868619	Aktiv	73	
120	48409570	2868369	Inaktiv	0	

121	48409571	2868252	Inaktiv	0	
122	48409572	2868643	Inaktiv	0	
123	48409573	2868797	Inaktiv	0	
124	48409574	2868192	Inaktiv	0	
125	48409575	2868722	Inaktiv	0	
126	48409576	2868874	Inaktiv	0	
127	48409577	2868928	Inaktiv	0	

128	48409578	2868219	Inaktiv	0	
129	48409579	3120364	Inaktiv	0	
130	48409580	2868059	Inaktiv	0	
131	48409581	2873342	Aktiv	100	
132	48409582	2872805	Aktiv	100	
133	48409583	2871986	Inaktiv	0	
134	48409584	3843745	Inaktiv	0	
135	48409585	3370613	Aktiv	92	

136	48409586	2901285	Inaktiv	0	
137	48409587	2900725	Aktiv	98	
138	48409588	4182169	Aktiv	100	
139	48409589	5322400	Inaktiv	0	
140	48409590	5322401	Aktiv	100	
141	48409591	5322402	Inaktiv	0	
142	48409592	5322403	Inaktiv	0	

143	48409593	5322404	Inaktiv	0	
144	48409594	1129645	Inaktiv	0	
145	48409595	5322405	Inaktiv	0	
146	48409596	5322406	Inaktiv	0	
147	48409597	5322407	Aktiv	100	
148	48409598	5322460	Inaktiv	0	
149	48409599	5322461	Aktiv	100	

150	48409600	5322462	Aktiv	85	
151	48409601	2925799	Inaktiv	0	