

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GRČAR

**PROUČEVANJE VEZAVE ZAVIRALCEV NAPETOSTNO ODVISNEGA  
NATRIJEVEGA KANALA 1.3 S POMOČJO MOLEKULSKEGA SIDRANJA**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA GRČAR

**PROUČEVANJE VEZAVE ZAVIRALCEV NAPETOSTNO ODVISNEGA  
NATRIJEVEGA KANALA 1.3 S POMOČJO MOLEKULSKEGA SIDRANJA**

**STUDYING THE BINDING OF VOLTAGE GATED SODIUM 1.3  
CHANNEL BLOCKERS WITH DOCKING**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

## **Zahvala**

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju Tihomirju za vso pomoč, dobro voljo, prijaznost in nasvete.

Hvala vsem prijateljem, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me podpirali. Hvala predvsem Tjaši, Andreji, Lidiji in Petri za vse skupaj preživete trenutke med študijem.

Iskrena zahvala gre tudi moji družini, mojim staršem, Luku in Niki. Hvala za vso pomoč in zaupanje vame in v to kar počnem.

Najbolj pa bi se zahvalila možu Roku, ki je vedno ob meni in me spodbuja.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno, pod mentorstvom izr. prof. dr. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Ljubljana, 2018

Kaja Grčar

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE .....	ii
POVZETEK .....	I
ABSTRACT .....	II
SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV .....	III
1. UVOD .....	1
1.1. PREDSTAVITEV TARČE.....	1
1.1.1. STRUKTURA.....	1
1.1.2. STRUKTURA BAKTERIJSKEGA KANALA .....	4
1.1.3. FIZIOLOŠKA VLOGA .....	4
1.2. PROUČEVANE UČINKOVINE .....	7
1.3. RAČUNALNIŠKO PODPRTO NAČRTOVANJE NOVIH UČINKOVIN .....	8
1.3.1. PRINCIP VIRTUALNEGA SIDRANJA MOLEKUL V VEZAVNO MESTO ..	9
1.3.2. PROCES VIRTUALNEGA SIDRANJA MOLEKUL V VEZAVNO MESTO ..	9
1.3.3. HOMOLOGNO MODELIRANJE .....	13
2. NAMEN DELA.....	15
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1. STRUKTURA PROTEINA.....	17
3.2. LIGANDI.....	17
3.3. UPORABLJENI PROGRAMI .....	22
3.3.1. FRED .....	22
3.3.2. LEADIT .....	24
3.3.3. eLEA3D .....	25
3.4. SIDRANJE.....	25
3.4.1. FRED .....	25

3.4.2. LEADIT .....	31
3.4.3. eLEA3D .....	32
3.5. VIZUALNI PREGLED REZULTATOV SIDRANJA.....	32
4. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	33
4.1. FRED .....	34
4.2. LEADIT .....	35
4.3. eLEA3D .....	35
4.4. PRIMERJAVA PROGRAMOV .....	36
5. SKLEP.....	50
VIRI IN LITERATURA.....	52

## POVZETEK

Napetostno odvisni natrijevi kanali so odgovorni za prenos natrijevih ionov preko membrane celic iz zunajceličnega v znotrajcelično okolje. To omogoči nastanek akcijskega potenciala, ki je osnova za prevajanje impulzov v vzdražnih celicah. Zaviralce napetostno odvisnih natrijevih kanalov trenutno uporabljamo kot antikonvulzive, antiaritmike in lokalne anestetike. Poznamo devet izoform napetostno odvisnih natrijevih kanalov, katerih izražanje je odvisno od tkiva, v katerem se nahajajo. Izoforme so si med seboj podobne, zato so zaviralci večinoma neselektivni.

Pri iskanju novih zaviralcev si lahko pomagamo tudi z računalniškimi metodami. Mednje spada tudi sidranje ligandov v vezavno mesto na proteinu. Za sidranje lahko uporabimo veliko različnih programov, pri čemer ustreznega lahko določimo tako, da v protein sidramo molekule z že znano afiniteto do proteina in ocenimo, kateri od programov se najbolj približa eksperimentalno pridobljenim rezultatom. V magistrski nalogi smo v homologni model človeškega napetostno odvisnega natrijevega kanala  $Na_v1.3$  sidrali ligande z znano vezavno afiniteto do tega kanala. Ligande smo sidrali s programi FRED, LeadIT in eLEA3D. Vsak od programov ligande sidra v vezavno mesto proteina z drugačnim algoritmom. S primerjavo številčnih vrednosti rezultatov cenilnih funkcij smo ugotovili, da sta nam program FRED in LeadIT dala primerljive rezultate, program eLEA3D pa veliko ligandov ni uspel sidrati.

Rezultate sidranja smo pregledali še s programom VIDA. Pri vizualnem pregledu smo ugotovili, da sta programa LeadIT in FRED ligande sidrala v podobno vezavno mesto, vendar ne nujno v povsem enaki konformaciji. Program eLEA3D je nekatere ligande od teh, ki jih je uspel sidrati, sidral v enako vezavno mesto, večino pa je sidral v povsem drugo vezavno mesto v proteinu. Dobljene rezultate z eLEA3D zato lahko ocenimo kot manj zanesljive.

Rezultate, ki smo jih dobili, lahko uporabimo pri načrtovanju novih zaviralcev napetostno odvisnega natrijevega kanala  $Na_v1.3$ . Pomembno pa je, da se zavedamo, da so optimizirani parametri posameznega programa za sidranje relevantni le za sidranje v to izoformo proteina in nekaj zelo sorodnih, ne pa na splošno za vse proteine.

Ključne besede: ionski kanali,  $Na_v1.3$ , molekulske sidranje, zaviralec

## ABSTRACT

Voltage-gated sodium channels are responsible for the transport of sodium ions through the cell membrane, from the extracellular to the intracellular space. That enables the initiation of action potential, which is the basis for the conduction of impulses in excitable cells. The inhibitors of voltage-gated sodium channels are currently being used as anticonvulsants, antiarrhythmics and local anaesthetics.

There are nine known isoforms of the voltage-gated sodium channels. Their expression depends on a certain tissue, where they are located. The isoforms have very similar amino acid sequences and structures, therefore inhibitors of voltage-gated sodium channels are usually non-selective. In the discovery of new inhibitors computational methods, such as molecular docking, can be used. There are lots of different programs that we can use for molecular docking. Determination of the most appropriate one can be made by first docking molecules with known affinity to protein and then evaluating these results.

In this thesis, we performed docking of the ligands with known affinity to the homology model of the human voltage-gated sodium channel Nav1.3. The ligands were docked using FRED, LeadIT and eLEA3D. Each of these programs uses different algorithms to dock the ligands into the protein binding site. By comparing numeric results from the programs we found out that LeadIT and FRED gave us comparable results, while eLEA3D could not dock most of the ligands.

The results of docking were visually inspected and studied in VIDA. We observed that LeadIT and FRED mostly gave us similar poses of the ligand in the binding site. eLEA3D on the other hand, gave us some similar results, but mostly the poses of the ligands were in different binding pocket(s) of the protein. Thus, the results from eLEA3D can be evaluated as less reliable.

To conclude, our results can be used for designing new voltage-gated sodium channel Nav1.3 inhibitors. It is important to understand that these results can be applied only for docking to this protein and some structurally very similar binding sites.

Key words: ion channels, Nav1.3, molecular docking, inhibitor

## SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

Na<sub>v</sub> - napetostno odvisni natrijev kanal

GABA - gama-aminobutanojska kislina

3D - tridimenzionalno

hNa<sub>v</sub> - človeški napetostno odvisni natrijev kanal

NaK kanal - natrij kalijev kanal

L - lizin

F - fenilalanin

Y - tirozin

N - asparagin

IC<sub>50</sub> - srednja zaviralna koncentracija oziroma koncentracija inhibitorja, pri kateri se tok natrijevih ionov skozi poro kanala zmanjša za 50 odstotkov.

MD - molekulska dinamika



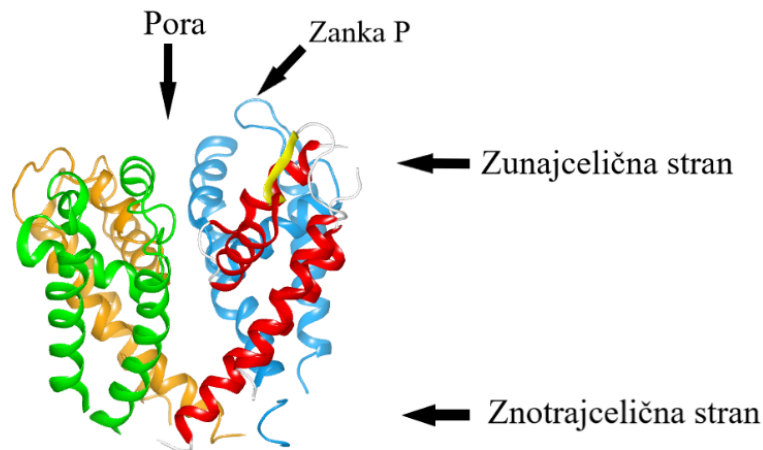
# 1. UVOD

## 1.1. PREDSTAVITEV TARČE

Ionski kanali so transmembranski proteini, ki tvorijo poro, skozi katero omogočijo pasiven prehod ionov skozi membrano celice (1). Najdemo jih v vseh celicah, ki se lahko vzdražijo, vključno z mišičnimi miociti in nevroni centralnega živčnega sistema. Natrijevi kanali so selektivno prepustni za natrijeve ione. Napetostno odvisni natrijevi kanali se odpirajo in zapirajo glede na spremembe membranskega potenciala (2).

### 1.1.1. STRUKTURA

Napetostno odvisni natrijevi kanali so kompleksni transmembranski proteini, ki so sestavljeni iz  $\alpha$ - in  $\beta$ -podenot.



*Slika 1 - Prikaz odprte konformacije  $Na_v1.3$  v programu VIDA. Zgornja stran je zunajcelična. Vsaka od štirih homolognih domen je na sliki prikazana z drugo barvo.*

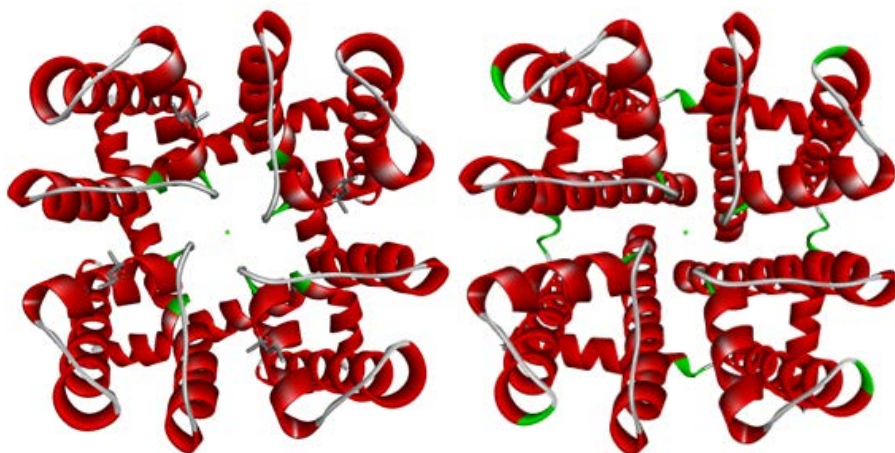
Podenota  $\alpha$  je dolg polipeptid, ki ga sestavljajo štiri homologne domene, od katerih je vsaka sestavljena iz šestih transmembranskih segmentov (Slika 1) (3). Vsaka  $\alpha$ -podenota je povezana vsaj z eno  $\beta$ -podenoto. Podenote  $\beta$  so kovalentno ali nekovalentno vezane na  $\alpha$ -podenoto in imajo vpliv na kinetiko ter odpiranje in zapiranje kanala v odvisnosti od membranskega potenciala (4).



*Slika 2 - Odprta konformacija proteina s poudarjenimi aminokislinskimi ostanki selektivnostnega filtra v modri barvi. Prikaz je narejen s programom VIDA.*

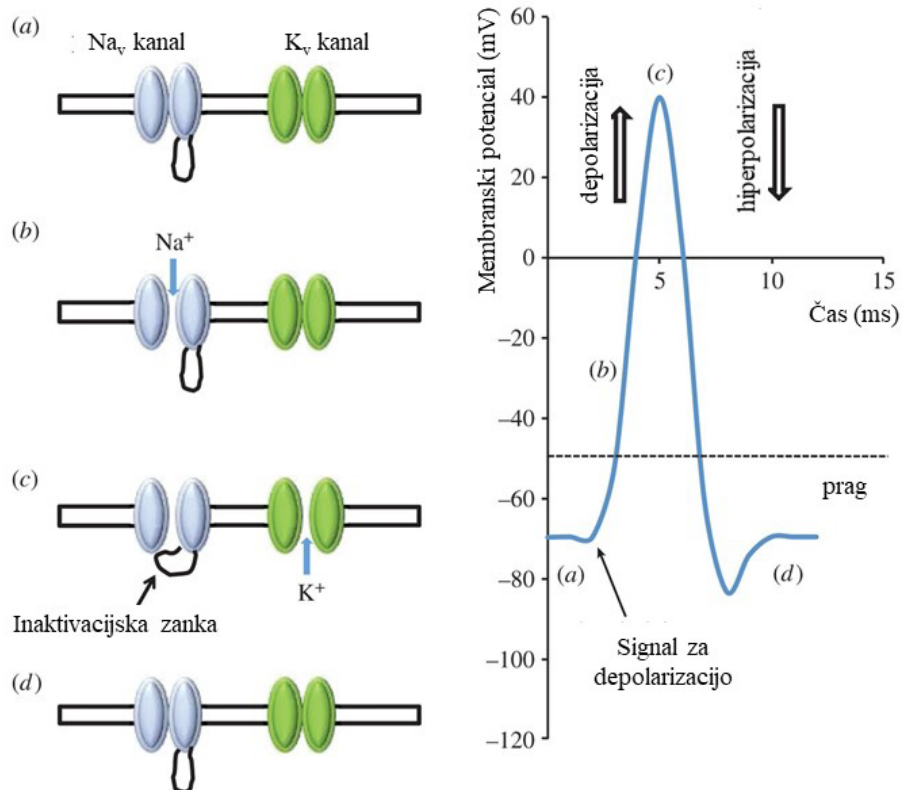
Poro tvorijo vijačnice S5 in S6 ter P-zanke, ki jih povezujejo. Na P-zanki je tudi selektivnostni filter, ki ga sestavljajo stranske verige štirih aminokislin (Slika 2), po ena iz vsake domene, in sicer v primeru človeškega kanala so to aspartat iz domene 1 (DI), glutamat iz domene DII, lizin iz domene DIII in alanin iz domene DIV (5).

Vijačnice S1-S4 iz vsake domene so odgovorni za zaznavanje sprememb napetosti oziroma membranskega potenciala membrane. Zaznavanje sprememb napetosti je pomembno za odpiranje, zapiranje in inaktivacijo kanala (6).



*Slika 3 – Kristalni strukturi odprtega (levo) in zaprtega (desno) kanala NaK iz bakterije Bacillus cereus.*

Napetostno odvisni natrijevi kanali obstajajo v treh stanjih: v odprtem, zaprtem (v mirovanju) (Slika 3) in inaktiviranem stanju. Med mirovnim membranskim potencialom so kanali v zaprtem stanju. Depolarizacija membrane povzroči premik sensorjev na zunanjo stran membrane (vijačnice S1-S4), zato se pora odpre. Kanal se nato preko inaktivacijskih procesov konformacijsko spremeni v inaktivirano stanje. Hiperpolarizacija membrane nato povzroči, da se kanal konformacijsko spremeni nazaj v zaprto konformacijo (Slika 4) (7).



Slika 4 - Prikaz zaprte (a in d), odprte (b) in inaktivirane (c) oblike kanala v odvisnosti od akcijskega potenciala. (prirejeno po (8))

### **1.1.2. STRUKTURA BAKTERIJSKEGA KANALA**

Prokariotski napetostno odvisni natrijevi kanali so homotetrameri. Vsak monomer ima šest transmembranskih segmentov. Segmenti S1-S4 so odgovorni za zaznavanje napetosti v membrani, podobno kot pri evkariontskem kanalu. Segmenta S5 in S6 vsake polipeptidne verige se združita, tako da tvorita poro. P-zanke vsake polipeptidne verige tvorijo selektivnostni filter (1). Aminokislinski ostanki, ki so najbolj pomembni za selektivnost filtra so tirozin, levcin in glutamat (2), pri človeškem kanalu je za selektivnost prav tako pomemben glutamat, hkrati pa so pomembne aminokisliline še aspartat, lizin in alanin (5). Dodatna razlika med bakterijskim in človeškim kanalom pa je tudi ta, da je človeški kanal heterotetramer, sestavljen iz štirih monomerov/polipeptidov, ki med sabo niso enaki, medtem ko je bakterijski kanal homotetramer, sestavljen iz štirih enakih monomerov/polipeptidov.

Strukturo prokariotskega kanala v več funkcionalnih stanjih so določili z rentgensko kristalografijo in krioelektronsko mikroskopijo. Katere regije in kateri aminokislinski ostanki so pomembni za vezavo ionov in za selektivnost, so določili s študijami divjega tipa in mutiranih tipov prokariotskega kanala (9).

Pri interakcijah s poro imajo zaradi njene strukture prednost monovalentni ioni, ki imajo podoben ali manjši radij kot natrij. Divalentni ioni, ki imajo podoben radij kot natrij, imajo preveč naboja, zato pride do odboja že pri vstopu v poro (9).

### **1.1.3. FIZIOLOŠKA VLOGA**

Napetostno odvisni natrijevi kanali so pomembni za veliko število fizioloških procesov, med drugim za nocicepcijo, lokomocijo in kognicijo. Odgovorni so za pasivni transport natrijevih ionov preko membrane celic. Ko se membrana depolarizira, se kanal odpre in povzroči vdor natrijevih ionov v celico. To omogoči nastanek akcijskega potenciala in prevajanja živčnih impulzov v vzdražnih celicah (5). Depolarizacija aksona, na primer, povzroči prenos senzoričnih informacij preko živčevja do možganov, kar možgani lahko dojamejo kot bolečino. Drug primer so mišice, v katerih akcijski potencial povzroči kontrakcijo mišic, kar omogoča gibanje telesa in krvi (4).

Mutacije v genih, ki kodirajo napetostno odvisne natrijeve kanale, lahko povzročijo epilepsijo, srčne aritmije in sindrom kronične bolečine. Do sedaj poznane zaviralce natrijevih kanalov uporabljamo kot antikonvulzive, antiaritmike in lokalne anestetike (4).

Zaenkrat je identificiranih devet izoform napetostno odvisnih natrijevih kanalov ( $Na_v$ ). Izoforme se med seboj razlikujejo v strukturi podenot  $\alpha$ . Nekateri izoforme so bolj pogoste v centralnem živčnem sistemu, druge v perifernem, tretje pa v mišičnih celicah (Preglednica 1) (5).

*Preglednica 1 - Pregled področij izražanja različnih izoform napetostno odvisnih natrijevih kanalov.*

Izoforma	Glavno področje izražanja	Druga področja izražanja
$Na_v1.1$ , $Na_v1.6$	centralni živčni sistem, periferno živčevje	srčna mišica
$Na_v1.2$ , $Na_v1.3$	centralni živčni sistem, periferno živčevje	
$Na_v1.4$	skeletne mišice	
$Na_v1.5$	srčna mišica	skeletne mišice, možgani
$Na_v1.7$ , $Na_v1.8$ , $Na_v1.9$	periferno živčevje	

Izoforme  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$  in  $Na_v1.6$  se izražajo predvsem v centralnem živčnem sistemu. Izoformi  $Na_v1.1$  in  $Na_v1.2$  se izražata v nevronih, v katerih se sintetizira in sprošča prenašalec GABA (gama-aminobutanojska kislina). Mutacije, ki privedejo do zmanjšane funkcije teh dveh izoform, zmanjšajo vzdražnost teh inhibitornih nevronov in s tem povzročijo povečano vzdražnost drugih nevronov. To lahko privede do epileptičnih napadov. Trenutno se za zdravljenje epilepsije uporabljajo neselektivni zaviralci natrijevih kanalov, kot so lamotrigin, fenitoin, karbamazepin, okskarbazepin in topiramid. Ker imajo zaradi slabe selektivnosti veliko neželenih učinkov, gre razvoj v smeri selektivnih zaviralcev kanala  $Na_v1.1$  (10).

Izoforma  $Na_v1.3$  je bolj pomembna pri nocicepciji. Zavirati jo želimo (skupaj z izoformami  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  in  $Na_v1.9$ ) pri zdravljenju kronične bolečine. S trenutnimi zaviralci težko dosežemo selektivnost, zato se pri zdravljenju z njimi pogosto pojavljajo neželeni učinki. Za zmanjšanje le-teh se trenutno uporablja lokalno zdravljenje, in sicer obliži z lidokainom. V izrednih primerih se uporablja tudi karbamazepin, ki se sicer uporablja za zdravljenje nevralgije trovejega živca. Poleg neželenih učinkov se pri karbamazepinu pojavlja tudi veliko interakcij z drugimi učinkovinami (11).

Izoforma  $Na_v1.4$  je odgovorna za nastanek akcijskega potenciala v miocitih. Mutacije v genu, ki kodira to izoformo, lahko povečajo delovanje kanala. Take mutacije so lahko vzrok periodičnih paraliz, kongenitalne paramiotonije in kongenitalnega miasteničnega sindroma. Za zdravljenje mionij in mišične šibkosti, za katere je odgovorno prekomerno delovanje izoforme  $Na_v1.4$ , uporabljamo nekatere dvovalentne katione ter nekatere lokalne anestetike in antiaritmike (4).

Izoforma  $Na_v1.5$  je pomembna pri nastanku akcijskega potenciala v srcu. Znanih je kar nekaj mutacij gena za  $Na_v1.5$ , ki povzročijo povečano delovanje kanala. Večina teh mutacij zmoti inaktivacijo kanala, zato se ta ne zapre popolnoma. Natrijevi ioni zato lahko nemoteno prehajajo skozi membrano, kar lahko povzroči podaljšanje intervala QT in atrijsko fibrilacijo. Mutacije, ki povzročijo izgubo funkcije kanala, lahko privedejo do aritmij, v ekstremnih primerih pa se lahko izrazi sindrom Burgada. Povečano je tudi tveganje za srčni zastoj. Zaviralci izoforme  $Na_v1.5$  so antiaritmiki prve skupine. Z zaviranjem kanala upočasnijo akcijski potencial med tahikardijo. Pri zdravih posameznikih lahko iste učinkovine izzovejo aritmije, zato moramo pri neselektivnih zaviralcih natrijevih kanalov, ki jih uporabljamo za druge indikacije, paziti, da se izognemo vsaj delovanju na izoformo  $Na_v1.5$ . Primeri učinkovin, ki se uporabljajo pri aritmijah, so amjodaron, vernakalant, kinidin, ajmalin, dronedaron, propafenon, meksiletin, dizopiramid in flekainid (4).

Izoforme  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  in  $Na_v1.9$  se nahajajo v perifernem živčevju. Predvsem izoformi  $Na_v1.7$  in  $Na_v1.8$  se nahajata v koži, zato motnje v njunem delovanju povzročijo predvsem motnje v dojetanju bolečine. Izoforma  $Na_v1.7$  se pojavlja tudi v celicah  $\beta$  trebušne slinavke in zato motnje v njenem delovanju lahko privedejo tudi do sladkorne bolezni (4).

Izoforma  $Na_v1.7$  se nahaja tudi v živčnih končičih senzoričnih nevronov, v ganglijih in v aferentnih nevronih hrbtenjače. Mutacije v genih, ki kodirajo to izoformo, lahko privedejo do motenj v zaznavanju bolečine s tem, ko spremenijo modulacijo aktivacije in deaktivacije kanala. Posledično se spremeni vzdražnost živčnih celic. Pri nekaterih celicah, kjer so izraženi mutirani napetostno odvisni natrijevi kanali  $Na_v1.7$ , so opazili hitrejšo degeneracijo aksonov in pacienti pogosto opažajo paroksimalno srbenje. Mutacije gena, ki kodira kanal  $Na_v1.7$ , lahko privedejo tudi do izražanja nefunkcionalnega kanala. Pacienti imajo zato lahko prirojeno neobčutljivost na bolečino in vonj. Če je neaktivna le ta izoforma, se vpliv neaktivnega kanala ne kaže v simpatičnem živčevju (4).

Poleg izoforme  $Na_v1.7$  se v ganglijih nevronov izraža tudi izoforma  $Na_v1.8$ . Ti kanali se aktivirajo pri bolj depolarizirani membrani kot v primeru izoforme  $Na_v1.7$ . Mutacije, ki povzročijo povečano delovanje kanala, privedejo do nevropatij. Povezujejo jih tudi z nevropatsko bolečino pri bolnikih s sladkorno boleznijo. Mutacije, ki zmanjšajo funkcijo kanala, se izrazijo z zmanjšano občutljivostjo na bolečino, vendar pacienti še vedno zaznavajo vonj (4).

Kanali  $Na_v1.9$  se aktivirajo pri hiperpolarizirani membrani. Njihova glavna vloga je vzdrževanje mirovnega membranskega potenciala, s čimer vplivajo na vzdražnost celice. Tudi mutacije v genih, ki kodirajo to izoformo, privedejo do neobčutljivosti na bolečino. Pri pacientih pogosto opazimo tudi mišično šibkost (4).

Izoforme  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  in  $Na_v1.9$  najdemo tudi v nevronih, ki oživčujejo dihalne poti. Motnje njihovega delovanja lahko povzročijo tudi draženje vagusa in s tem kašelj. Slednji je tudi simptom mnogih respiratornih okužb, zato lahko lokalne anestetike uporabljamo tudi za zaviranje kašlja, vendar je njihovo delovanje kratkotrajno (4).

Napetostno odvisni natrijevi kanali imajo pomembno vlogo pri metastazah in angiogenezi. Zaradi patološko povečanega izražanja natrijevih kanalov lahko rakave celice postanejo zelo invazivne. Nekateri zaviralci napetostno odvisnih natrijevih kanalov kažejo možne rezultate pri upočasnjevanju nastajanja novih metastaz (4).

## 1.2. PROUČEVANE UČINKOVINE

Pri našem delu smo proučevali tudi nekaj učinkovin, naštetih v nadaljevanju, katerih primarni mehanizem delovanja ni delovanje na napetostno odvisne natrijeve kanale  $Na_v1.3$ . Pri teh učinkovinah je lahko delovanje na napetostno odvisne natrijeve kanale  $Na_v1.3$  razlog za katerega od neželenih ali ugodnih stranskih učinkov. Učinkovine so skupaj z ostalimi molekulami, ki smo jih uporabili pri našem delu, predstavljene v Preglednici 2.

**Amitriptilin** je triciklični antidepresiv. Uporabljamo ga v terapiji depresije in pri nevropatski bolečini. Amitriptilin zavira ponovni privzem noradrenalina in serotonina v presinaptične nevrone, zato poveča njuno koncentracijo v sinapsi in prispeva k antidepresivnemu delovanju. Njegov metabolit nortriptilin deluje podobno, vendar ima močnejše delovanje na zaviranje prenosa noradrenalina kot serotonina. Amitriptilin pri blaženju nevropatske bolečine deluje že v manjših koncentracijah, kot pri depresiji. Nortriptilin uporabljamo tudi pri zdravljenju otroške nočne enureze. Obe učinkovini sta

antagonista tudi na velikem številu drugih receptorjev v centralnem živčnem sistemu, kot so serotoninški, adrenergični  $\alpha_1$ , histaminski in muskarinski holinergični receptorji. Neselektivnost vezave je odgovorna za številne neželene učinke amitriptilina (12).

**Meksiletin** je antiaritmik skupine Ib. Deluje na natrijeve kanale  $\text{Na}_v1.4$  v mišicah (13). Uporablja se pri zdravljenju ventrikularne tahikardije. Ker deluje tudi na druge natrijeve kanale, so pri njegovi uporabi pogosti centralni neželeni stranski učinki (glavobol, tremor, slabost...) (14).

**Tioridazin** je en izmed fenotiazinov. Spada med starejše nevroleptike, v zadnjem času pa ugotavljajo, da je učinkovit tudi pri zdravljenju tuberkuloze, kar je povečalo zanimanje za nadaljnje raziskave drugih potencialnih učinkov tioridazina (6).

**Ebastin** je antihistaminik druge generacije. Deluje na histaminske receptorje  $\text{H}_1$  (15). Uporabljamo ga pri zdravljenju sezonskega in kroničnega alergijskega rinitisa.

**Vinpocetin** je vinka alkaloid in sintetični derivat apovinkamina, ki se uporablja za povečanje prekrvavitve možganov po cerebrovaskularnih dogodkih in pri degenerativnih možganskih boleznih (16). Vinpocetin je inhibitor napetostno odvisnih natrijevih kanalov v možganih. Povečana koncentracija znotrajceličnega natrija je med drugim odgovorna za poškodbe živčnih končičev možganskih nevronov. Z zmanjšanjem koncentracije znotrajceličnega natrija v teh nevronih je poškodb celic manj (17).

### 1.3. RAČUNALNIŠKO PODPRTO NAČRTOVANJE NOVIH UČINKOVIN

V zadnjem času narašča število proteinov z znano tridimenzionalno strukturo, zato se vedno lažje osredotočamo na njih kot tarče. Računalniško podprto načrtovanje je postalo pri iskanju in razvoju novih učinkovin ključna komponenta. Ena izmed možnosti uporabe računalniških programov za odkrivanje novih učinkovin je tudi sidranje majhnih molekul v vezavna mesta proteinov. Uporabimo jo lahko kot presejalni test, ko imamo veliko bazo potencialnih spojin z želenim delovanjem, ali kasneje, ko imamo že izbrano spojino vodnico in jo želimo le optimizirati. Vpliv sprememb v strukturi spojine vodnice lahko dokaj učinkovito preverimo z računalniškim modelom (18).



### **1.3.1. PRINCIP VIRTUALNEGA SIDRANJA MOLEKUL V VEZAVNO MESTO**

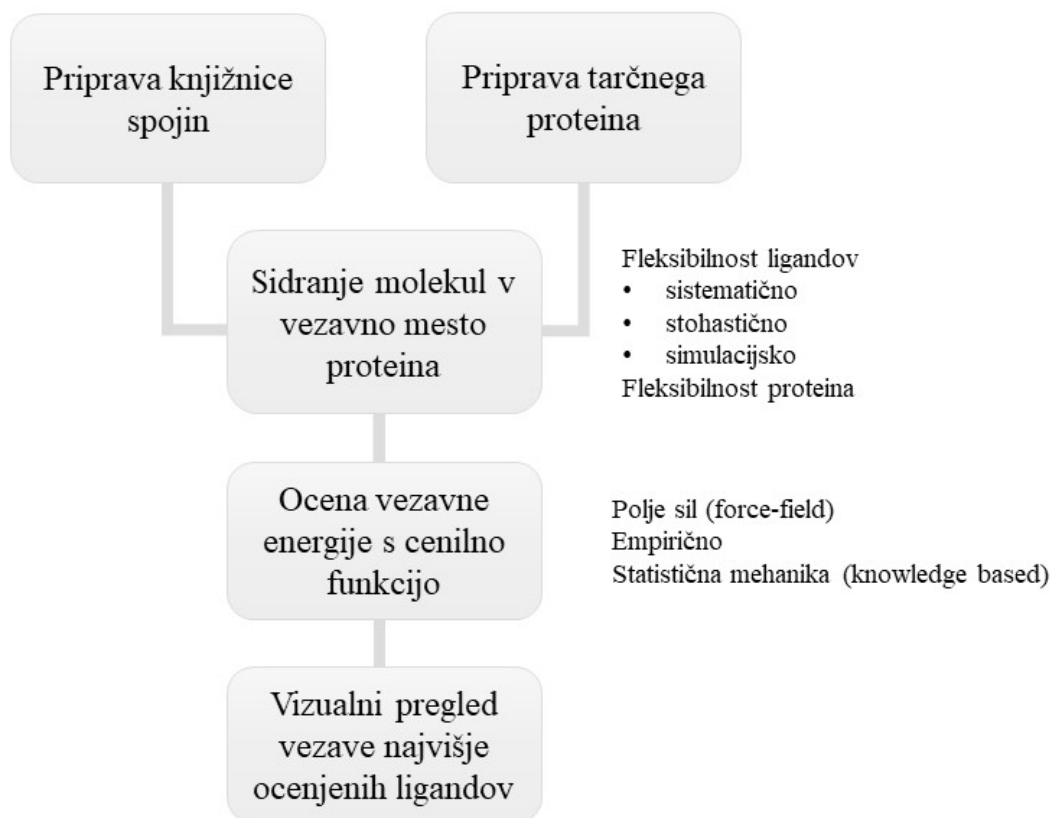
Virtualno sidranje ligandov v vezavno mesto proteina v osnovi lahko deluje s tremi različnimi strategijami:

- Protein je predstavljen kot rigidna struktura, prav tako je kot rigiden obravnavan ligand. Upoštevajo se le translacijske in rotacijske prostostne stopnje liganda, ne pa tudi konformacijske.
- Protein je obravnavan kot rigidna struktura, upoštevamo pa vse prostostne stopnje liganda, torej translacije, rotacije in konformacije.
- Protein je obravnavan fleksibilno, prav tako raziščemo vse prostostne stopnje liganda (19).

Za napoved pravilne vezave liganda v vezavno mesto proteina je odgovoren algoritem za sidranje in naša priprava proteina in ligandov. Znati moramo tudi razlikovati med bolj in manj verjetnimi pozami liganda v vezavnem mestu ter med ligandi z visoko in nizko afiniteto za vezavo. Za to so pomembne cenilne funkcije. Za vrednotenje pravih poz lahko uporabimo tudi vizualni pregled predvidenih poz v vezavnem mestu proteina.

### **1.3.2. PROCES VIRTUALNEGA SIDRANJA MOLEKUL V VEZAVNO MESTO**

V začetni fazi virtualnega sidranja molekul v vezavno mesto proteina izvedemo pripravo knjižnice spojin, ki jo bomo uporabili za sidranje, in pripravo vezavnega mesta proteina (Slika 5). Nato izvedemo sidranje molekul v definirano vezavno mesto proteina. Na voljo imamo različne programe, ki večinoma upoštevajo fleksibilnost ligandov na tri različne načine (20). Na koncu moramo rezultate ovrednotiti, za to v prvi vrsti poskrbijo že cenilne funkcije programov. Da izmed vseh dobro ocenjenih molekul izberemo tiste, ki imajo največjo verjetnost, da bodo delovale na izbrano tarčo, pa so pomembne tudi izkušnje raziskovalca, ki se ukvarja z molekulskim modeliranjem.



Slika 5 - Shematski prikaz procesa virtualnega sidranja molekul v vezavno mesto proteina.

#### PRIPRAVA KNJIŽNICE SPOJIN

Knjižnico spojin lahko pridobimo od različnih dobaviteljev spojin ali pa vanjo vključimo že znane spojine, ki smo jih sintetizirali sami. V prvem primeru je prvi korak zmanjšanje knjižnice z različnimi filtri, s katerimi izločimo spojine z neugodnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot je na primer velika molekulska masa, slaba topnost, velika lipofilnost itd. Spojina, za katero želimo, da je učinkovita v telesu, mora imeti določene lastnosti podobne že znanim učinkovinam. Pogosto so prvi filter večjih knjižnic spojin pravila Lipinskega, ki določajo optimalne parametre za doseganje biološke aktivnosti učinkovin. Biološko aktivne molekule naj bi imele molekulska masa pod 500, največ pet donorjev in največ deset akceptorjev vodikove vezi ter logP (koeficient, ki nam pove, kako se molekula razporedi med lipofilno in hidrofilno fazo) pod 5. Dodatno se kot filter uporablja število vrtljivih vezi v molekuli in polarna površina molekule. Običajno se izloči tudi spojine, ki so potencialno toksične ali kemijsko nestabilne. Lastnosti, ki jih mora imeti učinkovina za določeno tarčo, pa so odvisne tudi od tarče same.

Knjižnico spojin, ki jo bomo uporabili za samo sidranje, moramo pripraviti v tridimenzionalnem zapisu.

## SIDRANJE MOLEKUL V VEZAVNO MESTO PROTEINA

Sidranje molekul v vezavno mesto je kompleksen proces. V osnovi ga lahko razdelimo na umeščanje molekule v vezavno mesto in ocenjevanje interakcij med tarčo in potencialnim ligandom, ki se veže v njeno vezavno mesto.

Pri sidranju lahko predpostavimo neko rigidno konformacijo liganda. Za čim boljše rezultate mora biti rigidna konformacija, ki jo uporabimo, v energijskem minimumu ali v biološko aktivni konformaciji. Lahko pa upoštevamo njegovo fleksibilnost. Fleksibilnost liganda lahko obravnavamo na tri načine: sistematsko, naključno oziroma stohastično in s simulacijskimi metodami (18).

Sistematični algoritmi, ki obravnavajo fleksibilnost liganda, skušajo upoštevati vse prostostne stopnje molekule. To lahko povzroči nastanek ogromnega števila konformacij ligandov, zato se ligandi običajno izgrajujejo v vezavnem mestu. Program lahko najprej v tarčo veže fragmente liganda, ki jih nato med seboj poveže. Druga možnost je, da razdeli ligand na rigidne in fleksibilne dele. Nato najprej sidra rigidne dele, ki jim nato doda fleksibilne.

Naključni oziroma stohastični algoritmi delujejo tako, da naključno spreminjajo konformacijo liganda ali populacijo ligandov. Vezavo liganda oceni glede na prej definirane verjetnosti vezave funkcionalnih skupin, ki ga sestavljajo, s funkcionalnimi skupinami v vezavnem mestu proteina. Fleksibilnost proteina močno podaljša čas sidranja, ne pridobimo pa veliko na kakovosti samih rezultatov, zato se manj uporablja.

## OVREDNOTENJE SIDRANJA

Rangiranje različnih poz/konformacij istega liganda v vezavnem mestu in rangiranje različnih ligandov med seboj s pomočjo cenilne funkcije je pomemben del strukturno podprtega virtualnega reševanja. Tudi če so vrednosti cenilne funkcije izračunane vezavne konformacije zelo visoke, so rezultati neuporabni, če ne ločimo med dobrimi in slabimi pozami.

Rezultate lahko vrednotimo kot vsoto energij, in sicer energije med receptorjem in ligandom, notranje energije liganda in včasih notranje energije proteina. Interakcije med receptorjem in ligandom običajno opišemo z energijo van der Waalsovih in elektrostatskih interakcij med ligandom in aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu proteina. Običajno rezultate vrednotimo na ta način, kadar imamo eno konformacijo proteina. Večina teh funkcij upošteva le entalpijske, ne pa tudi entropijskih prispevkov.

Druga možnost so empirične funkcije ocenjevanja, ki upoštevajo vsoto posameznih med seboj nepovezanih dejavnikov. Empirične dejavnike se preprosto ovrednoti, vendar tudi ti temeljijo na približkih. Empirične funkcije lahko upoštevajo tudi ne-entalpijske prispevke, kot je približek entropijskih prispevkov vrtljivih vezi ligandov (angl. *rotor term*).

Izkustvene funkcije ocenjevanja rezultatov so tretja možnost. Temeljijo na eksperimentalno pridobljenih podatkih o interakcijah med atomi liganda in proteina. Te funkcije so enostavne za računanje, zato se lahko učinkovito oceni veliko število spojin v relativno kratkem času.

Ocenjevanje s kombinacijo različnih cenilnih funkcij ali ocenjevanje na osnovi konsenza se v zadnjem času vedno bolj uveljavlja. Prednost tega ovrednotenja je izničenje napak ocenjevanja ene funkcije in s tem povečanje verjetnosti, da povečamo število pozitivnih in zmanjšamo število lažno pozitivnih rezultatov.

Za katero funkcijo vrednotenja se bomo odločili, je odvisno od več dejavnikov. Nobena od funkcij ni optimalna za vse družine proteinov. Vezavna mesta ter proces prepoznavanja in vezave ligandov v protein so namreč specifična za vsak protein. Zato je smiselno raziskati, katera funkcija je najboljša za protein, ki ga proučujemo (18).

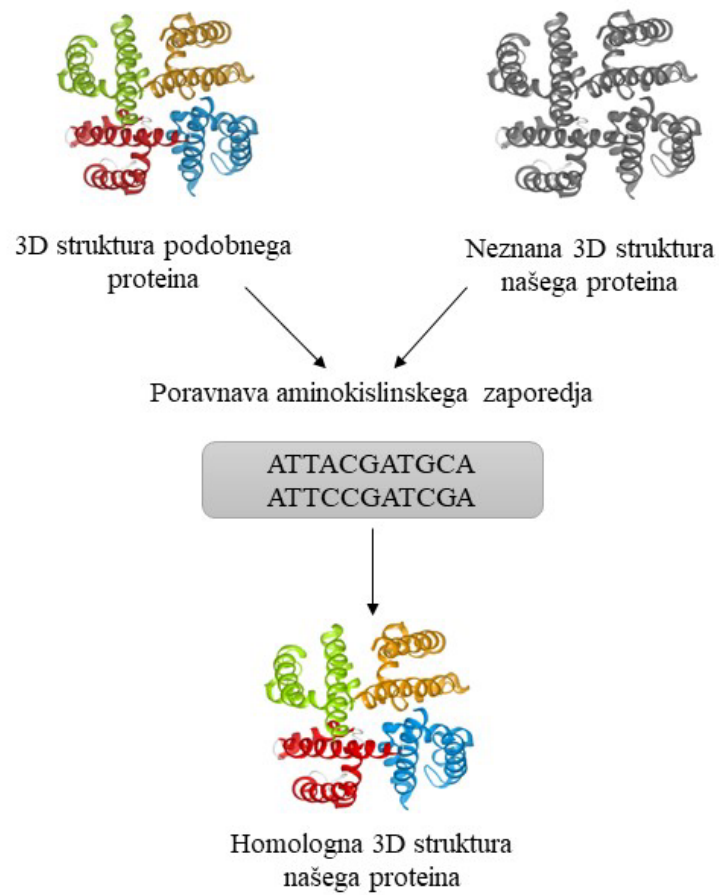
## OVREDNOTENJE CENILNE FUNKCIJE

Cenilne funkcije, ki so vključene v programe za molekulsko sidranje omogočajo približno realno oceno sidranja. Primernost cenilne funkcije za naše molekule in protein lahko ocenimo tako, da večjemu števil neaktivnih spojin dodamo manjše število aktivnih spojin. Cenilna funkcija mora prepoznati molekule, za katere vemo, da se vežejo v vezavno mesto tarčnega proteina in jih oceniti z visoko oceno cenilne funkcije. Poleg tega mora z dobro oceno ovrednotiti čim manj molekul, ki v resnici niso aktivne, torej lažno pozitivnih spojin. Dodatno lahko preverimo učinkovitost cenilne funkcije, da sidramo v vezavno mesto proteina ligand iz kristalne strukture, pri čemer mora biti vrednost RMSD (angl. *root mean square distance*) manjša ali enaka 2,5 Å.

### 1.3.3. HOMOLOGNO MODELIRANJE

Za sidranje molekul v vezavno mesto proteina moramo imeti na voljo tridimenzionalno (3D) strukturo proteina. Za določitev 3D strukture tarčnega proteina lahko uporabimo eksperimentalne metode (rentgenska kristalografija, NMR spektroskopija, krioelektronska mikroskopija) ali homologno modeliranje. Eksperimentalne metode so običajno drage in dolgotrajne, zato se velikokrat poslužujemo homolognega modeliranja (18).

Homologno modeliranje je proces, s katerim izračunamo 3D strukturo tarčnega proteina (Slika 6). Za to potrebujemo 3D strukturo proteina sorodnega tarčnemu proteinu in poravnavo aminokislinskih zaporedij obeh proteinov. Modeli, ki jih dobimo s homolognim modeliranjem, so najbolj točni, če so si aminokislinska zaporedja tarčnega in sorodnega proteina podobna (>30% enakost aminokislinskih zaporedij) (21). Bolj pravilno napovemo strukturo proteina, tudi če se protein, ki ga vzamemo za predlogo, v telesu nahaja v podobnih pogojih kot naš protein (22).

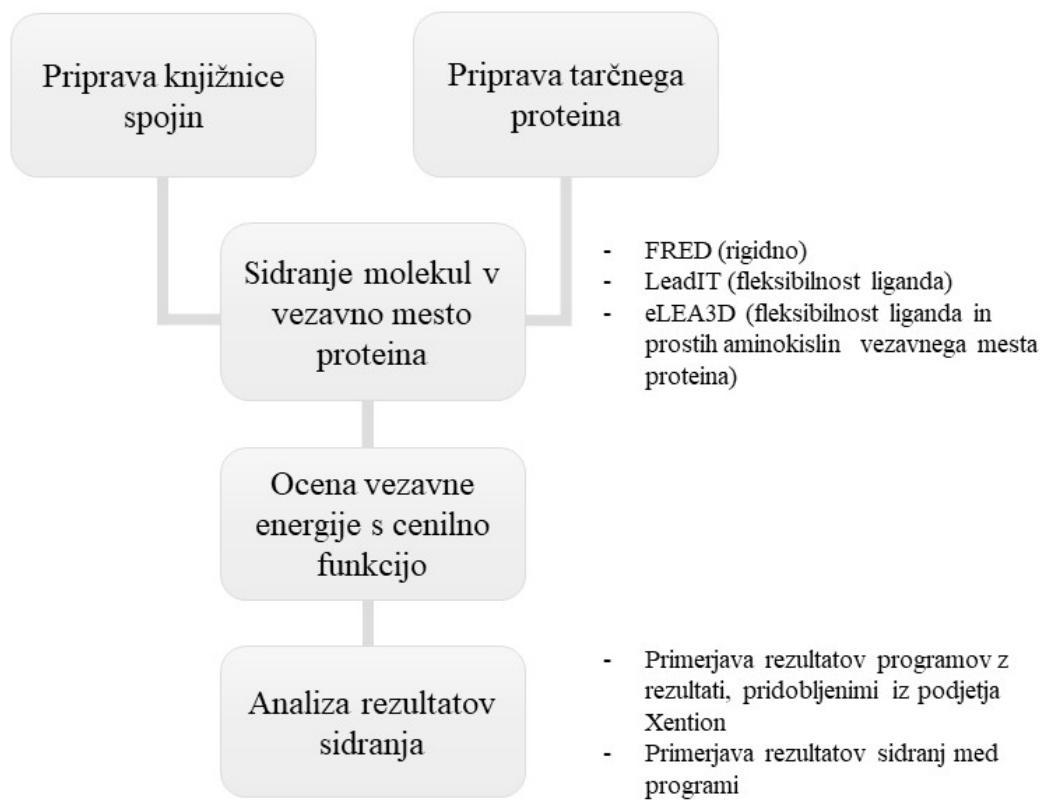


*Slika 6 - Shematski prikaz principa homolognega modeliranja.*

## 2. NAMEN DELA

Zaviranje delovanja napetostno odvisnih natrijevih kanalov uporabljamo pri zdravljenju različnih bolezni. Pri iskanju novih zaviralcev napetostno odvisnih natrijevih kanalov uporabljamo tudi računalniške metode, kot je sidranje potencialnih ligandov v vezavno mesto proteina. Metode sidranja ligandov in cenilne funkcije vrednotenja vezave se med seboj razlikujejo. Za različne proteine so optimalne različne cenilne funkcije in metode sidranja, zato je smiselno raziskati, katera je najboljša za proučevani protein.

Namen magistrske naloge bo raziskati, kateri od programov, ki jih bomo uporabili za sidranje ligandov v človeški napetostno odvisni natrijev kanal  $\text{Na}_v1.3$ , najpravilneje napove vezavo ligandov v vezavno mesto tega proteina in njihovo afiniteto. S pomočjo treh različnih programov bomo poskušali čim bolj napovedati vezavo testnih molekul, dobljene rezultate pa bomo nato primerjali z eksperimentalnimi rezultati, pridobljenimi iz podjetja Xention. Sidrali bomo šest molekul z močnim zaviralnim delovanjem na natrijev kanal  $\text{hNa}_v1.3$  ( $\text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$ ) in devet s šibkim zaviralnim delovanjem ( $\text{IC}_{50} > 5 \mu\text{M}$ ). S tem bomo lahko ovrednotili, kako dobro program napove vezavo molekul v tarčni protein in ali uspe spojine razvrstiti glede na eksperimentalno določeno jakost vezave. Potek dela je shematsko predstavljen tudi v spodnji shemi (Slika 7).



Slika 7 - Shema načrta dela.



### **3. MATERIALI IN METODE**

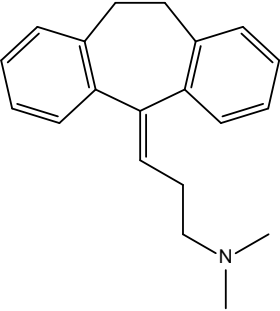
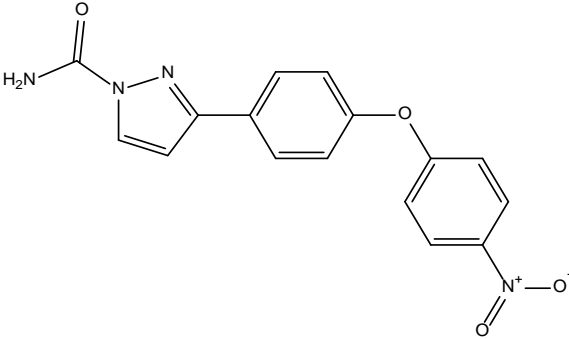
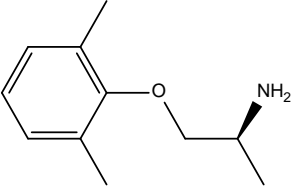
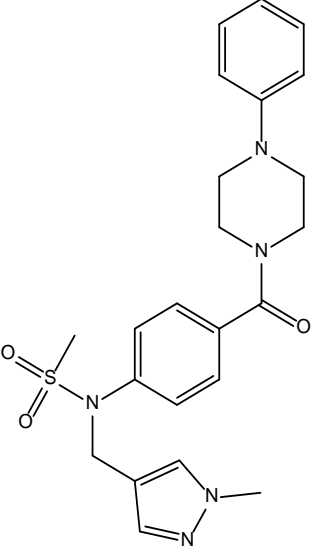
#### **3.1. STRUKTURA PROTEINA**

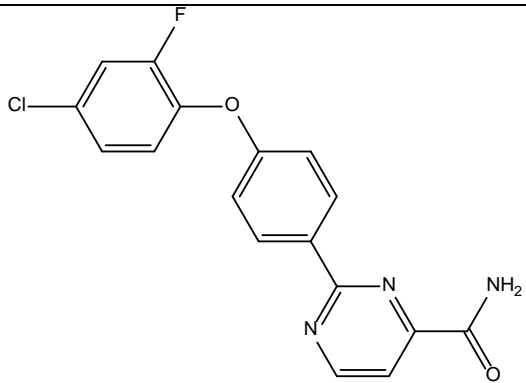
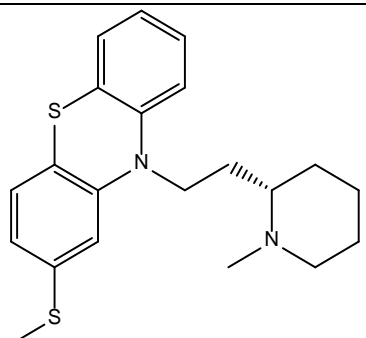
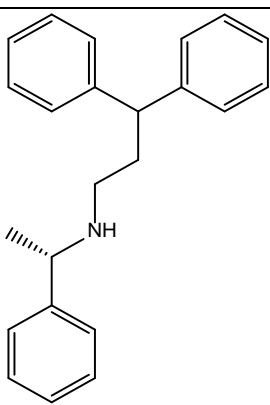
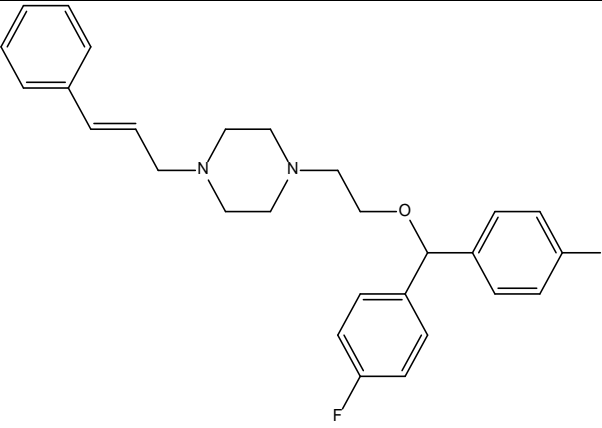
V okviru te magistrske naloge smo izbrane spojine sidrali v homologni model človeškega proteina  $Na_v1.3$ , ki je bil izdelan na osnovi kristalne strukture bakterijskega napetostno odvisnega natrijevega kanala. Za modeliranje zaprte konformacije proteina je bila uporabljena kristalna struktura natrijevega kanala iz bakterije *Arcobacter butzleri* (PDB koda: 3RVY) (23). Za modeliranje odprte konformacije proteina pa je bila uporabljena odprta struktura NaK kanala iz bakterije *Bacillus cereus* (PDB koda: 3E86) (24).

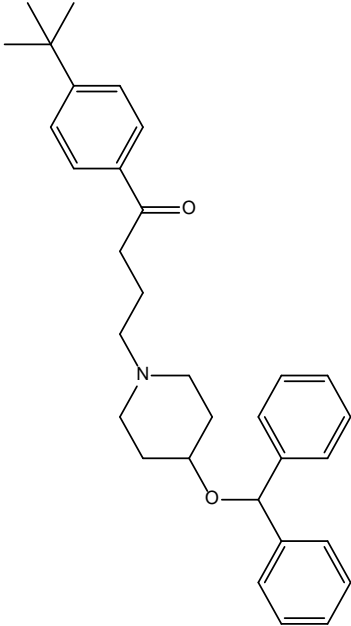
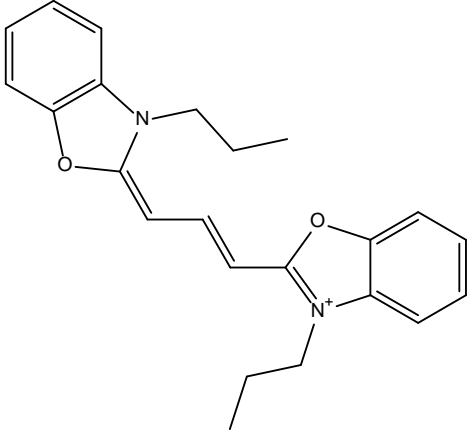
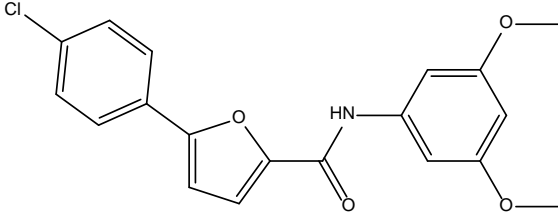
#### **3.2. LIGANDI**

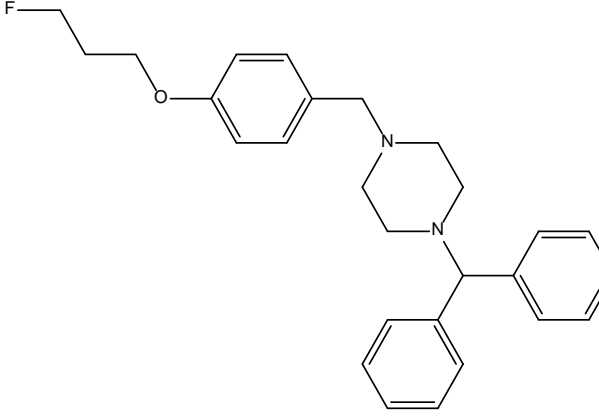
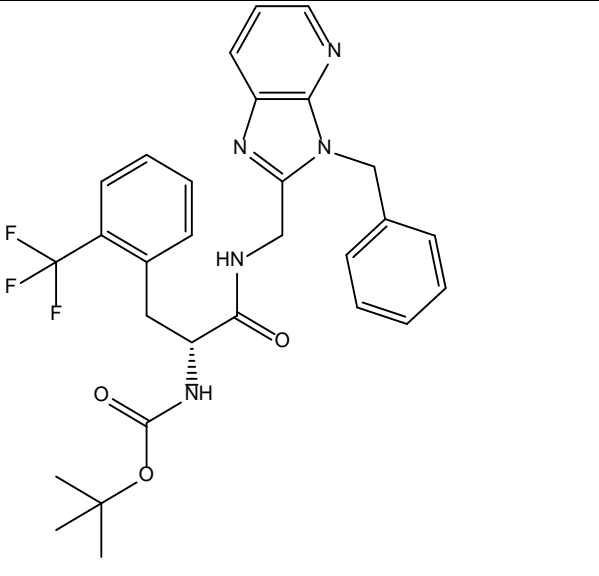
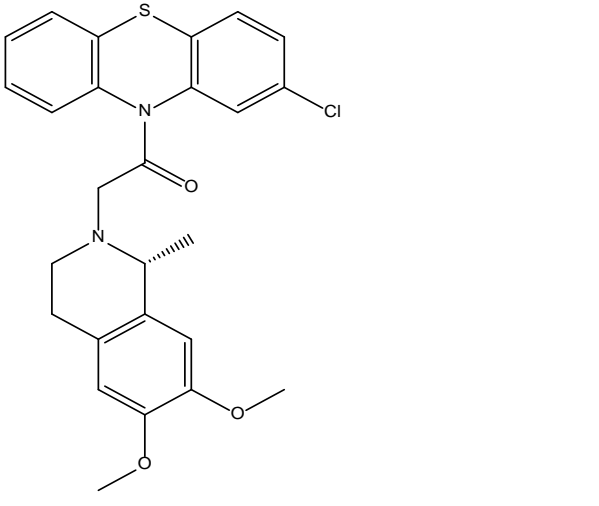
Knjižnico spojin z eksperimentalno določenim zaviralnim delovanjem na  $Na_v1.3$ , ki smo jih sidrali v vezavno mesto tega proteina, smo dobili iz podjetja Xention. Nekatere od spojin so že znane učinkovine za katero drugo indikacijo, druge pa so podobne že znanim učinkovinam. Iz podjetja Xention smo dobili tudi eksperimentalne rezultate zaviralnega delovanja teh ligandov v odprto in zaprto konformacijo  $Na_v1.3$ , ki smo jih uporabili za primerjavo z rezultati naših sidranj. V spodnji preglednici (Preglednica 2) so predstavljene strukture ligandov, ki smo jih uporabili in njihovo oznako iz podjetja Xention.

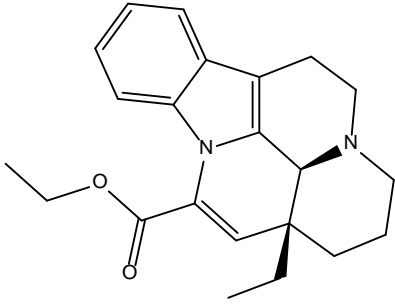
Preglednica 2 – Struktura ligandov, ki smo jih uporabili pri sidranju, skupaj z njihovimi imeni iz podjetja Xention.

1	
XEN00013341 amitriptilin IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 2,9±0,6 μM	
2	
XEN00016251 IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 1,1±0,4 μM	
3	
XEN00016507 meksiletin IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 21,9±8,8 μM	
4	
XEN00017861 IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 6,2 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 5,5±2,2 μM	

5	
XEN00017911 IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 6,5±1,6 μM	
6	
XEN00018053 tioridazin IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 7,5±2,0 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 3,6±0,5 μM	
7	
XEN00018671 IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 8,2±1,7 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 2,5±0,8 μM	
8	
XEN00018679 spojina podobna vanokserinu IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 8,0±1,3 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 5,2±2,3 μM	

9	
<p>XEN00018687 ebastin IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 7,5±2,5 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 5,5±2,2 μM</p>	 <p>The chemical structure of ebastin consists of a central piperidine ring. One carbon of the piperidine ring is substituted with a 4-(tert-butylphenyl)butanoyl group. Another carbon is substituted with a diphenylmethoxy group. The nitrogen atom of the piperidine ring is also substituted with a propyl group.</p>
10	
<p>XEN00018699 IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 9,0±1,7 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 5,1±1,8 μM</p>	 <p>The chemical structure of XEN00018699 features a central trans-alkene bridge. One end of the bridge is attached to a 2-propyl-4,5-benzoxazole ring. The other end is attached to a 2-propyl-1,2,3-benzoxazolium ring, where the nitrogen atom carries a positive charge.</p>
11	
<p>XEN00024117 IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 4,5±1,1 μM</p>	 <p>The chemical structure of XEN00024117 is a hybrid molecule. It features a furan ring substituted with a 4-chlorophenyl group and a propionamide group. The propionamide group is further substituted with a 3,4,5-trimethoxyphenyl group.</p>

12	 <p>XEN00024279 IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 9,5±3,9 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 3,0±1,4 μM</p>
13	 <p>XEN00027166 IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 28,0±3,4 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 12,4±2,2 μM</p>
14	 <p>XEN00030330 IC<sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC<sub>50</sub> odprta konformacija: 18,3±9,6 μM</p>

15	
XEN00030459 vinpocetin IC <sub>50</sub> zaprta konformacija: 30 μM IC <sub>50</sub> odprta konformacija: 7,0±1,2 μM	

### 3.3. UPORABLJENI PROGRAMI

Pri delu smo za sidranje uporabili tri različne programe. Vsak od programov za sidranje ligandov v vezavno mesto proteina uporablja različne algoritme. Primerjali smo komercialne programe (FRED, LeadIT) z brezplačnim serverjem za sidranje eLEA3D.

#### 3.3.1. FRED

Prvi program, ki smo ga uporabili za sidranje, je FRED (25, 26) (kratica za Fast Rigid Exhaustive Docking, kar v prevodu pomeni hitro, rigidno in izčrpno sidranje) iz zbirke za molekulsko modeliranje OpenEye Scientific Software (<https://www.eyesopen.com>). FRED med sidranjem obravnava ligand kot rigidno strukturo, zato mu predhodno pripravimo zbirko različnih konformacij ligandov s pomočjo programa OMEGA (27) (28), ki je prav tako del programskega paketa OpenEye. Ker je pristop k sidranju takšen, da predpostavlja rigidno strukturo ligandov in proteina, je sidranje zelo hitro.

Preden začnemo s sidranjem ligandov s pomočjo programa FRED, moramo pripraviti receptor oziroma vezavno mesto tarčnega proteina. Ena od možnosti je priprava s programom MAKE\_RECEPTOR, ki je prav tako del programskega paketa OpenEye. V tem grafičnem vmesniku določimo prostor ali t. i. škatlo (angl. *box*), ki zavzema aminokislino, ki so del vezavnega mesta proteina. Sledi določitev vezavnega mesta za sidranje (angl. *Cavity detection*) s pomočjo algoritma »Atomic«, ki je hitrejši, vendar manj natančen, ali algoritma »Molecular«, ki je počasnejši, ampak tudi bolj natančen.

Določimo lahko tudi farmakoforne zahteve za sidranje (angl. *Constraints*). S slednjimi definiramo interakcije, npr. vodikove vezi, ki jih mora ligand tvoriti v vezavnem mestu. Tega se poslužujemo le v primeru, ko vemo, da je interakcija ključna za vezavo in brez nje ni delovanja na tarčni protein. Obstaja pet tipov farmakofornih zahtev, in sicer kontaktne,

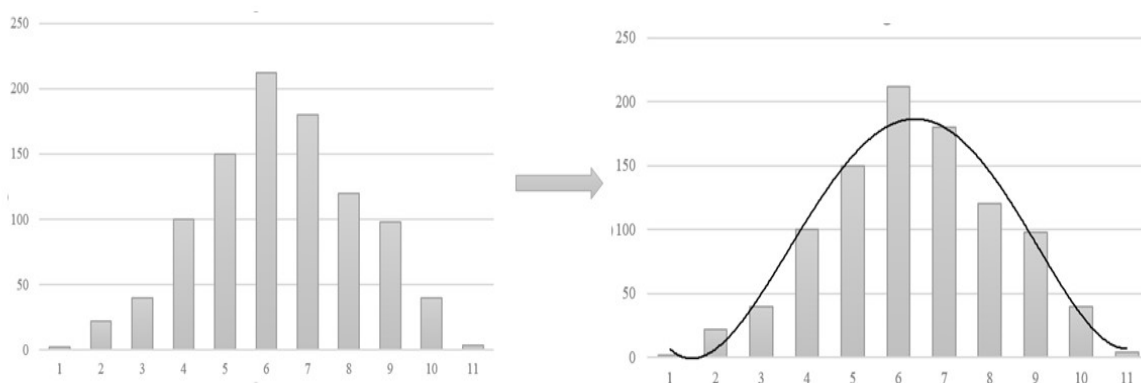
lipofilne, donorske, akceptorske in kelatorske interakcije, pri čemer vsak atom lahko tvori le eno od teh interakcij.

Molekule, ki jih želimo sidrati s programom FRED, lahko prej pripravimo s programom OMEGA, ki je prav tako del programskega paketa OpenEye. S tem programom lahko molekule iz eno- ali dvodimenzionalnega zapisa prevedemo v tridimenzionalni zapis. Če pri tem upoštevamo tudi konformacijske prostostne stopnje, lahko ustvarimo zbirke več konformacij ene molekule in nato FRED vsako od konformacij sidra v protein (29).

Potek sidranja s programom FRED lahko razdelimo na več korakov:

- Iskanje vseh rotacij in translacij vsake konformacije vseh ligandov ter sidranje vseh možnosti vsake konformacije liganda v vezavno mesto.
- Izločanje poz, ki se sterično ne ujemajo z vezavnim mestom proteina, ali pa so predaleč od vezavnega mesta (to določimo s pomočjo parametra zunanja kontura (angl. *Outer contour*))
- Izločanje vseh poz, ki nimajo vsaj enega težkega atoma znotraj območja okrog vezavnega mesta, ki ga določimo s parametrom notranja kontura (angl. *Inner contour*).
- Izločanje vseh poz, katerih vezava se ne sklada s farmakofornimi zahtevami (interakcije z določenimi aminokislinskimi ostanki), ki smo jih predhodno določili (angl. *Constraints*) (30).

Za ocenjevanje sidranja uporablja cenilno funkcijo Chemgauss (31). Cenilna funkcija Chemgauss3 pri ocenjevanju interakcij upošteva prileganje, vodikove vezi med ligandom in proteinom, vodikove vezi s topilom, interakcije med kovino in kelatorjem itd. Vse interakcije so ovrednotene kot funkcije razdalje in prenesene v koordinatni sistem, kjer se jih prilagodi (zgladi) v obliko Gaussove krivulje (Slika 8).

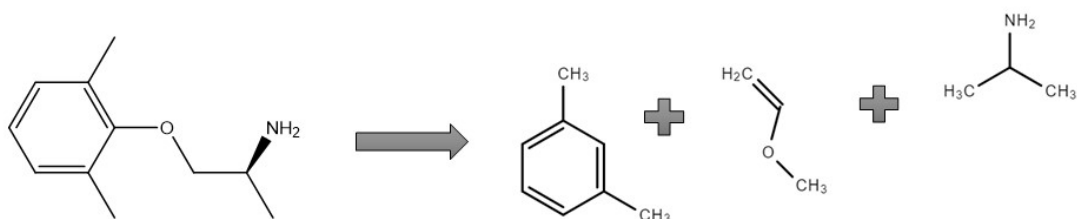


Slika 8 - Simbolični prikaz glajenja histograma podatkov.

Prileganje program oceni na podlagi razporeditve težkih atomov, vodikove vezi pa na podlagi razdalje med donorjem in akceptorjem vodikove vezi. Pri tem upošteva tudi vpliv topila oziroma koliko vodikovih vezi tvori protein s topilom pred vezavo liganda in koliko jih nato lahko izpodrine ligand. Program upošteva le kelacijo med kovinskimi ioni v vezavnem mestu proteina in kelatorskimi skupinami v ligandu (32).

### 3.3.2. LeadIT

Drugi program, ki smo ga uporabili za sidranje, je FlexX, ki je del programskega paketa LeadIT (BioSolveIT GmbH) (33). FlexX ligande pri sidranju razdeli na fragmente, nato pa okrog sidranega osnovnega/baznega fragmenta postopoma izgrajuje ligand (34). FlexX je eden izmed programov, ki pri sidranju upoštevajo fleksibilnost liganda, in sicer vse prostostne stopnje.



Slika 9 - Simbolični prikaz fragmentacije liganda, struktura fragmentov je narisana s spletnim programom Chemspider (<http://www.chemspider.com/StructureSearch.aspx>).



Program najprej razdeli ligand na fragmente. Ligand je nato fleksibilno zgrajen v vezavnem mestu. FlexX za izgradnjo liganda uporablja algoritem drevesa. En fragment določi kot osnovni, nato pa naslednjega doda v vseh možnih pozah/konformacijah. Z izgradnjo liganda nadaljuje tako, da naslednjega doda na vse možne poze vseh možnih poz drugega fragmenta in tako naprej. Različne poze so nato ocenjene z različnimi cenilnimi funkcijami in uporabniku so nato na voljo vsi možni podatki. Pri tem je zelo pomembno, kako pravilno algoritem napove pozo v vezavnem mestu (35).

Za vrednotenje uporablja funkcijo ChemScore, ki je empirična cenilna funkcija (36). Funkcija vključuje veliko parametrov, na primer  $\Delta G$  (sprememba proste energije, ki se sprosti med vezavo liganda), upošteva tudi prileganje proteina in liganda ter notranjo energijo liganda. Upošteva hidrofobne učinke, vodikove vezi in interakcije s kovinskimi kationi. Izračun je hiter in cenilna funkcija daje dobre rezultate. Uporablja se tudi v programu GOLD (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)) (37).

### 3.3.3. eLEA3D

Tretji program za sidranje, ki smo ga uporabili, je program na spletni strani eLEA3D (<http://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/>) (38). Program molekule razdeli na fragmente, ki jih nato poveže med seboj z genetskim algoritmom. eLEA3D nam pri vsakem sidranju lahko poda različne rezultate sidranja, ker je izbira fragmentov naključna.

eLEA3D (kratica za Ligand by Evolutionary Algorithm) sidra ligande s pomočjo evolucijskega algoritma, ki temelji na programu PLANTS (39). Algoritem PLANTS razdeli ligand na fragmente in jih naključno sidra v protein. Zaradi velikega števila fragmentov lahko hitro pride do ogromne količine podatkov, zato mora program na določen način zmanjšati število podatkov, kar v programu PLANTS temelji na stohastičnih optimizacijskih algoritmih (39). Program upošteva tudi torzijo stranskih aminokislin proteina in s tem vsaj delno upošteva tudi fleksibilnost proteina (39).

## 3.4.SIDRANJE

### 3.4.1. FRED

Najprej smo spojine sidrali s programom FRED. Za sidranje smo spojine pripravili s pomočjo programa OMEGA, ki ustvari knjižnico konformacij vsakega liganda. Vezavno

mesto proteina smo pripravili s programom OpenEye Make\_Receptor. Nato smo s programom FRED sidrali molekule v zaprto in odprto konformacijo človeškega  $\text{Na}_v1.3$ .

V programu Make\_Receptor smo proteinu določili vezavno mesto s tem, da smo določili aminokislinske ostanke, ki so najverjetneje udeleženi pri vezavi ligandov. To so asparagin 417, lizin 1460, fenilalanin 1759 in tirozin 1766, ki se nahajajo v pori kanala in za katere so pokazali, da tvorijo interakcije z lokalnimi anestetiki (40). Sidranje smo ponavljali z različnimi nastavitvami, pri čemer smo spreminjali velikost vezavnega mesta, farmakoforne zahteve in obliko potenciala (Preglednica 3). Za sidranje smo pripravili vseh pet konformacij proteina. Na voljo smo imeli zaprto in odprto konformacijo proteina  $\text{Na}_v1.3$ . Na obeh je bila izvedena simulacija molekulske dinamike (MD) in za sidranje smo uporabili zaprto obliko pred simulacijo MD (prva zaprta konformacija) in na koncu simulacije MD (druga zaprta konformacija) ter odprto obliko pred, med in po simulaciji MD.

Pri prvi zaprti konformaciji proteina (zaprta konformacija proteina pred simulacijo MD) smo za detekcijo vezavnega mesta vedno uporabili natančnejšo molekulsko detekcijo. Najprej smo spreminjali obliko potenciala, ki je lahko usmerjena proti topilu, proti proteinu ali pa je uravnotežena. Nato pa smo povečali še škatlo za določitev vezavnega mesta. Z merami in posledično prostornino škatle določimo velikost vezavnega mesta, v katerega naj bi se ligandi vezali. Z večanjem vezavnega mesta povečamo možnosti, da se ligand v vezavno mesto veže, vendar hkrati povečamo tudi možnosti, da se veže na napačno mesto in tvori interakcije s skupinami aminokislinskih ostankov, ki so v proteinu na takem mestu, da za vezavo sploh niso na voljo. Z zunanjo konturo določimo obliko vezavnega mesta. Poskušali smo tudi z določanjem farmakofornih zahtev, tj. aminokislinskih ostankov, ki nam določajo vezavno mesto in s tem izboljšajo možnosti, da bo program vezal ligande v pravilen vezavni žep v vezavnem mestu proteina. Izbrane nastavitve programa za vsako od sidranj so predstavljene v spodnji preglednici (Preglednica 3).

*Preglednica 3 - Prikaz nastavitve sidranja s programom FRED za prvo zaprto konformacijo proteina.*

hNa <sub>v</sub> 13_closed_start						
	volumen škatle [Å <sup>3</sup> ]	velikost škatle [Å*Å*Å]	detekcija vezavnega mesta	oblika potenciala	zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	farmakoforne zahteve
1	2473	14,15*15,5*11,27	molekulska	uravnorežen	1413	/
2	2474	14,15*15,5*11,28	molekulska	proti topilu	1440	/
3	2474	14,15*15,5*11,29	molekulska	proti proteinu	1438	/
4	3870	16,67*18,33*12,67	molekulska	uravnorežen	1789	L1460, F1759, Y1766

Pri drugi zaprti konformaciji proteina (zaprta konformacija proteina po simulaciji MD) smo detekcijo vezavnega mesta prav tako nastavili na molekulsko, obliko potenciala pa pri obeh poskusih uravnoreženo med entropijsko in entalpijsko vodenimi procesi. Sidrali smo v vezavni mesti dveh velikosti in določili farmakoforne zahteve (Preglednica 4).

*Preglednica 4 - Nastavitve sidranja s programom FRED za drugo zaprto konformacijo proteina.*

hNa <sub>v</sub> 13_closed_last						
	volumen škatle [Å <sup>3</sup> ]	velikost škatle [Å*Å*Å]	detekcija vezavnega mesta	oblika potenciala	zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	farmakoforne zahteve
1	2874	15,77*15,94*11,44	molekulska	uravnorežen	1428	/
2	3653	17,37*16,65*12,63	molekulska	uravnorežen	3149	L1460, F1759, Y1766

Pri prvi odprti konformaciji proteina smo imeli detekcijo vezavnega mesta nastavljeno na molekulsko, obliko potenciala pa na uravnoreženo. Spreminjali smo mere škatle in zunanje konture ter dodajali farmakoforne zahteve (Preglednica 5).

*Preglednica 5 - Prikaz nastavitve sidranja s programom FRED za prvo odprto konformacijo proteina.*

hNav13_open_start						
	volumen škatle [Å <sup>3</sup> ]	velikost škatle [Å*Å*Å]	detekcija vezavnega mesta	oblika potenciala	zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	farmakoforne zahteve
1	3367	14,19*20,24*11,73	molekulska	uravnovežen	1420	/
2	3818	15,29*19,76*12,63	molekulska	uravnovežen	3781	L1460, F1759, Y1766
3	3818	15,29*19,76*12,63	molekulska	uravnovežen	3781	L1460, F1759, Y1766
4	2295	16,33*18,33*7,67	molekulska	uravnovežen	2295	L1460, F1759, Y1766
5	12618	26,00*28,00*17,33	molekulska	uravnovežen	2360	L1460, F1759, Y1766
6	2374	11,00*22,33*9,67	molekulska	uravnovežen	882	/
7	2030	17,00*14,33*8,33	molekulska	uravnovežen	906	L1460, F1759, Y1766

Tudi pri drugi odprti konformaciji proteina smo imeli podobne nastavitve. Ponovno smo spreminjali le velikost škatle in zunanje konture ter dodali farmakoforne zahteve (Preglednica 6).

*Preglednica 6 - Prikaz nastavitvev sidranja s programom FRED za drugo odprto konformacijo proteina.*

hNav <sub>v</sub> 13_open_frame_2300						
	volumen škatle [Å <sup>3</sup> ]	velikost škatle [Å*Å*Å]	detekcija vezavnega mesta	oblika potenciala	zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	farmakoforne zahteve
1	3591	18,47*15,56*12,5	molekulska	uravnorežen	1466	/
2	3968	23,97*16,56*10,00	molekulska	uravnorežen	3834	L1460, F1759, Y1766
3	2024	15,33*14,67*9,00	molekulska	uravnorežen	696	/
4	2024	15,33*14,67*9,00	molekulska	uravnorežen	1182	/
5	2755	16,67*16,00*10,33	molekulska	uravnorežen	1449	/
6	2371	16,00*15,33*9,67	molekulska	uravnorežen	1182	L1460, F1759, Y1766
7	3640	18,00*17,33*11,67	molekulska	uravnorežen	2124	/

Pri tretji odprti konformaciji proteina smo spreminjali le volumen škatle in zunanje konture ter farmakoforne zahteve. Kot farmakoforno zahtevo smo nastavili tudi aminokislinski ostanek N417 (asparagin 417) (Preglednica 7).

*Preglednica 7 - Prikaz nastavitve sidranja s programom FRED za zadnjo odprto konformacijo proteina.*

hNav13_open_MD_last						
	volumen škatle [Å <sup>3</sup> ]	velikost škatle [Å*Å*Å]	detekcija vezavnega mesta	oblika potenciala	zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	farmakoforne zahteve
1	3336	15,33*20,33*10,83	molekulska	uravnovežen	1443	/
2	4049	16,00*22,33*11,33	molekulska	uravnovežen	1457	N417, L1460, F1759, Y1766
3	3872	16,00*22,00*11,00	molekulska	uravnovežen	2586	N417, L1460, F1759, Y1766
4	20601	24,87*30,43*27,22	molekulska	uravnovežen	2508	N417, L1460, F1759, Y1766
5	20601	24,87*30,43*27,22	molekulska	uravnovežen	18299	N417, L1460, F1759, Y1766
6	4243	15,67*17,67*15,33	molekulska	uravnovežen	1476	L1460, F1759
7	3785	15,12*18,77*13,34	molekulska	uravnovežen	3529	L1460, F1759, Y1766
8	3785	15,12*18,77*13,34	molekulska	uravnovežen	3529	/
9	4130	15,67*18,83*14,00	molekulska	uravnovežen	1727	/
10	3600	15,00*18,00*13,33	molekulska	uravnovežen	1458	/

### 3.4.2. LeadIT

V grafičnem vmesniku programskega paketa LeadIT smo najprej določili vezavno mesto proteina in njegov radij. V nadaljevanju smo spreminjali različne parametre, kot je na primer število rešitev za vsako fragmentacijo. V poskusu na proteinu open\_MD\_last smo večali število rešitev za vsak fragment in vsako iteracijo iz 200 na 500 in kasneje na 2000. Za večino nadaljnjih sidranj smo število rešitev za vsak fragment in vsako iteracijo ohranili na 500.

Spreminjali smo tudi radij vezavnega mesta okrog referenčnega liganda (6,5 Å, 15 Å in 20 Å). Slednji je predstavljal eno od poz iz sidranja s programom FRED (glej zgoraj), s čimer je bila določitev vezavnega mesta lažja. Vezavno mesto je ne glede na določen radij vključevalo ključne aminokislinske ostanke - asparagin 417, lizin 1460, fenilalanin 1759 in tirozin 1766 -, s katerimi dokazano interagirajo lokalni anestetiki. Pri manjšem določenem vezavnem mestu dobimo bolj točne rezultate, a že z majhno napako pri določanju vezavnega mesta lahko naredimo veliko napako, ker ni dovolj prostora za vezavo ligandov. Obratno pri večjem radiju se večina ligandov lahko veže v definirano vezavno mesto, vendar te vezave niso nujno relevantne.

Spreminjali smo tudi upoštevanje entropijskega in entalpijskega vpliva oz. kombinacije obeh (angl. *Hybrid*). Pri sidranju entalpijski vpliv predstavljajo direktne interakcije med ligandom, topilom in proteinom ter konformacijske spremembe med sidranjem. Entropijske vplive pa predstavljajo konformacijska, rotacijska, translacijska in vibracijska entropija ter hidrofobnost topila. Entropijski vplivi so torej bolj odvisni od velikosti ligandov, prisotnosti vode v vezavnem mestu in jakosti njene vezave. Pomembna je tudi hidrofobnost liganda, medtem ko fleksibilnost liganda in konformacijski dejavniki vplivajo tudi na entalpijsko komponento.

Sidranje smo izvedli na vseh petih konformacijah proteina in upoštevali eno pozo vsakega liganda. Pri sidranju v zadnjo odprto konformacijo proteina smo izvedli eno sidranje tudi z upoštevanjem desetih poz vsakega liganda. Pregled vseh nastavitev je predstavljen v preglednici 8.

*Preglednica 8 - Prikaz nastavitve najboljših sidranj s programom LeadIT za vseh pet konformacij proteina.*

Konformacija proteina	Referenčni ligand	Radij aminokislin, ki določajo vezavno mesto [Å]	Strategija sidranja
hNav1.3 open start	XEN00018679	6,5	Entropijsko vodena
hNav1.3 open frame 2300	XEN00018671	6,5	Hibridna
hNav1.3 open MD last	XEN00024279	6,5	Entropijsko vodena
hNav1.3 closed start	XEN00024279	6,5	Entropijsko vodena
hNav1.3 closed last	XEN00017861	6,5	Hibridna

### 3.4.3. eLEA3D

Sidranje smo izvedli na vseh petih konformacijah proteina, spreminjali smo aminokislinski ostanek, okrog katerega sidramo molekule. Radij vezavnega mesta smo nastavili na 10 Å in spreminjali aminokislino, ki določajo vezavno mesto. Pri vseh konformacijah smo poskusili nastaviti kot aminokislino, ki določajo vezavno mesto, asparagin 417, levcin 1460, tirozin 1766 in fenilalanin 1759. To so aminokislino, za katere domnevamo, da interagirajo z domnevnimi ligandi.

## 3.5. VIZUALNI PREGLED REZULTATOV SIDRANJA

Dobljene rezultate vseh programov smo pregledali s programom VIDA (programski paket OpenEye), ki omogoča vizualni pregled rezultatov sidranja, s pomočjo pogleda FRED View. Ta pogled nam prikaže sidrano vezavo liganda v vezavnem mestu proteina in vodikove vezi, ki jih ligand lahko tvori z vezavnim mestom.

Rezultate smo primerjali tudi z rezultati aktivnosti teh spojin, ki smo jih pridobili iz podjetja Xention. S tem smo želeli ugotoviti, kako dobro je vsak od programov sposoben napovedati aktivnost posamezne spojine in razlikovati med aktivnimi in neaktivnimi spojinami.



## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

Rezultate sidranja za vsako konformacijo proteina s pomočjo vseh treh programov pri različnih nastavitvah smo predstavili v preglednicah 11-15. Pregledali smo, kako je program rangiral spojine s pomočjo cenilne funkcije in jih primerjali z eksperimentalno pridobljenimi rezultati. Dobljene vrednosti cenilne funkcije smo razvrstili v razrede. Z razvrščanjem v razrede smo skušali izničiti vpliv analitske napake na vrednotenje rezultatov. Nato nas je zanimalo, kako dobro je program napovedal uvrstitev vsakega liganda v razrede. Sešteli smo absolutne razlike med razredom, v katerega je ligand uvrstil program, in eksperimentalno pridobljenim rezultatom.

Pri eksperimentalnih rezultatih smo v najslabši razred uvrstili ligande, ki so imeli  $IC_{50}$  (srednja zaviralna koncentracija oziroma koncentracija inhibitorja, pri kateri se tok natrijevih ionov skozi poro kanala zmanjša za 50 odstotkov) večji od  $10\ \mu\text{M}$ , v razred ligandov s srednje dobro vezavo ligande, ki so imeli  $IC_{50}$  med 3 in  $10\ \mu\text{M}$ , v najboljši razred pa ligande, ki so imeli  $IC_{50}$  nižji od  $3\ \mu\text{M}$ . Meje razredov smo postavili glede na referenčne vrednosti o jakosti inhibitorjev napetostno odvisnih natrijevih kanalov iz podjetja Xention.

Pri rezultatih, pridobljenih s programoma FRED in LeadIT, smo v razred z najmanjšo pričakovano vezavo uvrstili ligande, ki so dosegli vrednost cenilne funkcije večjo od -10, v srednji razred ligande, ki so dosegli vrednost cenilne funkcije med -10 in -17, v najboljši razred pa ligande z vrednostjo cenilne funkcije nižje od -17.

V programu eLEA3D je vrednotenje drugačno, zato smo razrede prilagodili. V razred z najmanjšo verjetnostjo vezave liganda v vezavno mesto smo uvrstili ligande, ki so dosegli vrednost cenilne funkcije manjšo od 50, v srednji razred ligande z vrednostjo cenilne funkcije med 50 in 70 in v najboljši razred ligande z vrednostjo cenilne funkcije višjo od 70.

## 4.1.FRED

Program FRED smo ocenili na podlagi absolutnih razlik med razredom, v katerega se je sidral ligand in razredom, v katerega naj bi se sidral glede na eksperimentalne vrednosti zaviranja kanala Na<sub>v</sub>1.3. Ugotovili smo, da smo dobili pri zaprtih konformacijah bistveno boljše rezultate, če smo v vezavnem mestu kot farmakoforne zahteve določili še aminokislinske ostanke L1460, F1759 in Y1766, ki se nahajajo v predvidenem žepu vezavnega mesta. Pri prvi začetni odprti konformaciji smo prav tako poskušali z določanjem farmakofornih zahtev. Za boljše pa so se izkazali rezultati, ki smo jih dobili, če smo zmanjšali zunanjo konturo, torej velikost žepa, v katerega se sidrajo ligandi. Pri drugi odprti konformaciji smo najmanjše absolutne razlike dobili pri zadnjem sidranju, kjer smo povečali velikost istega žepa. Pri vizualnem pregledu rezultatov smo ugotovili, da je razlog to, da so se nekateri ligandi v večjem žepu lažje vezali, vendar ne v predvideno vezavno mesto.

Pri zadnji odprti konformaciji proteina smo, podobno kot pri prvi, najboljše rezultate dobili z manjšanjem velikosti žepa, tudi če smo odstranili farmakoforne zahteve v vezavnem mestu. Podatki za najboljša sidranja so predstavljeni v Preglednici 9. Pri vseh najboljših sidranjih smo imeli molekulsko detekcijo vezavnega mesta, obliko potenciala pa uravnoteženo.

*Preglednica 9 - Prikaz nastavitve najboljših sidranj s programom FRED za vseh pet konformacij proteina.*

Konformacija proteina	Škatla [Å <sup>3</sup> ]	Mere škatle [Å*Å*Å]	Zunanja kontura [Å <sup>3</sup> ]	Farmakoforne zahteve
hNa <sub>v</sub> 1.3 open start	2374	11*22,33*9,67	882	/
hNa <sub>v</sub> 1.3 open frame 2300	3640	18,00*17,33*11,67	2124	/
hNa <sub>v</sub> 1.3 open MD last	3600	15,00*18,00*13,33	1458	/
hNa <sub>v</sub> 1.3 closed start	3870	16,67*18,33*12,67	1789	L1460, F1759, Y1766
hNa <sub>v</sub> 1.3 closed last	3653	17,37*16,65*12,63	3149	L1460, F1759, Y1766

## 4.2. LeadIT

Pri opazovanju številčnih rezultatov sidranja smo ugotovili, da je vpliv upoštevanja termodinamskih učinkov zanemarljiv (ali so entalpijski, entropijski ali kombinacija), dobimo pa boljše rezultate, če število rešitev za vsak fragment (SpF) in za vsako iteracijo (SpI) povečamo z 200 na 500. Pri povečanju na 2000 nismo opazili bistvenega izboljšanja, zato smo za nadaljnje delo parametra SpI in SpF nastavili na 500. S povečevanjem radija sidranja se rezultati prav tako izboljšujejo, vendar se hkrati povečuje možnost, da se ligandi sidrajo v napačno mesto v proteinu in so numerični rezultati zato lažno boljši. S povečanjem števila poz, ki jih program na koncu sidranja shrani, smo dobili vpogled v to, kako se možne poze lahko razlikujejo. Pri večini ligandov opazimo dve ali tri skupine različnih poz.

## 4.3. eLEA3D

Pri programu eLEA3D smo sidranje izvedli v vezavno mesto, ki smo ga določili z različnimi referenčnimi aminokislinskimi ostanki, za katere so pokazali, da interagirajo z lokalnimi anestetiki. Čeprav se ti aminokislinski ostanki nahajajo v predvidenem vezavnem žepu, smo kljub temu dobili pri različnih sidranjih zelo različne rezultate. Za primerjavo programov smo uporabili rezultate sidranja, pri katerem je program uspel sidrati čim več ligandov.

*Preglednica 10 - Prikaz števila sidranih ligandov s programom eLEA3D glede na izbran referenčni aminokislinski ostanek proteina.*

konformacija proteina	ASN 417	LEU 1460	PHE 1759	TYR 1766
open start	1	4	8	12
open frame 2300	0	6	6	3
open last	0	5	4	11
closed start	0	1	4	2
closed last	0	6	1	0

Pri konformaciji hNav1.3\_open\_start in hNav1.3\_open\_MD\_last smo za primerjavo programov uporabili sidranje z referenčno aminokislino tirozin 1766, pri konformaciji hNav1.3 open frame 2300 in hNav1.3 closed last levcin 1460, pri konformaciji hNav1.3 closed start pa fenilalanin 1759.

#### **4.4.PRIMERJAVA PROGRAMOV**

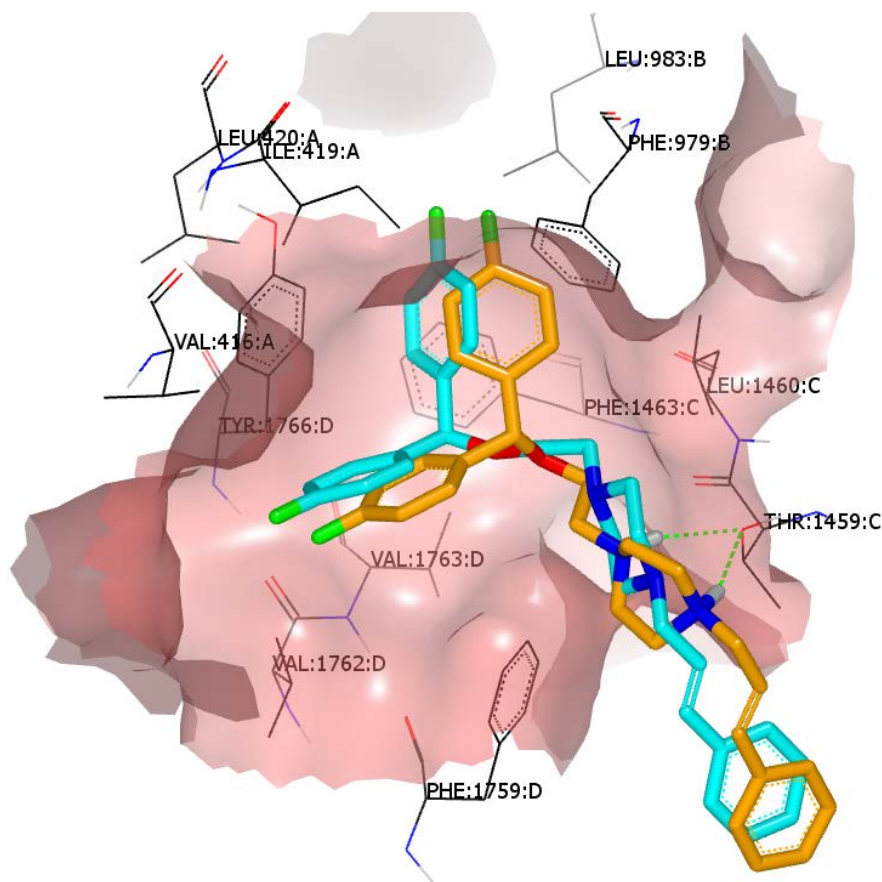
Rezultati najboljših sidranj za vsako konformacijo proteina so predstavljeni v spodnjih preglednicah. V preglednicah rezultatov zaprtih konformacij proteina Na<sub>v</sub>1.3 vidimo, da so programi večinoma pravilno napovedali vezavo spojin, ki so se eksperimentalno izkazale za učinkovite. Najboljše poze vsakega sidranja smo še vizualno pregledali s programom VIDA.

Program FRED je pri prvem sidranju skoraj vse razrede napovedal pravilno. Vsa napačna predvidevanja so v bistvu blizu mejnim vrednostim razreda. Program LeadIT je za tri ligande napovedal dobro vezavo, čeprav so se eksperimentalno izkazali za neučinkovite (vsaj pri vezavi v zaprto konformacijo proteina). Program eLEA3D večine ligandov ni uspel sidrati.

Preglednica 11 - Rezultati sidranja v prvo zaprto konformacijo proteina.

Eksperimentalno		FRED			LeadIT			eLead3d			
ligand	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	razred	vrednost	razred	abs. razlika	vrednost	razred	abs. razlika	vrednost	razred	abs. razlika
XEN00013341	30,0	0	-10,20	1	1	-12,10	1	1	0,00	0	0
XEN00016251	30,0	0	-7,82	0	0	-25,45	2	2	0,00	0	0
XEN00016507	30,0	0	-7,13	0	0	-9,47	0	0	0,00	0	0
XEN00017861	6,2	1	-9,85	0	1	-18,41	2	1	0,00	0	1
XEN00017911	30,0	0	-8,56	0	0	-20,98	2	2	0,00	0	0
XEN00018053	7,5	1	-10,34	1	0	-11,59	1	0	0,00	0	1
XEN00018671	8,2	1	-10,85	1	0	-14,46	1	0	75,47	2	1
XEN00018679	8,0	1	-12,09	1	0	-19,34	2	1	78,78	2	1
XEN00018687	7,5	1	-11,19	1	0	-16,82	1	0	0,00	0	1
XEN00018699	9,0	1	-10,47	1	0	-11,37	1	0	0,00	0	1
XEN00024117	30,0	0	-9,89	0	0	-16,36	1	1	52,08	1	1
XEN00024279	9,5	1	-10,42	1	0	-16,37	1	0	65,02	1	0
XEN00027166	28,0	0	-9,90	0	0	-14,13	1	1	0,00	0	0
XEN00030330	30,0	0	-10,95	1	1	-20,44	2	2	0,00	0	0
XEN00030459	30,0	0	-10,21	1	1	-12,42	1	1	0,00	0	0
vsota absolutnih razlik					4			12			7

Pri pregledu rezultatov s programom VIDA smo ugotovili, da program LeadIT ligandov z rezultatom 0 ni uspel sidrati. Na spodnji sliki (Slika 10) je predstavljena vezava enega izmed ligandov (ligand 8), ki so ga uspeli sidrati vsi programi. Z oranžno barvo je predstavljen ligand, sidran s programom LeadIT, in z modro ligand, sidran s programom FRED. Liganda, sidranega s programom eLEA3D, na sliki ne moremo videti. Iz tega lahko sklepamo, da se je vezal na povsem drugo mesto v proteinu. Zaključimo lahko, da tako FRED kot LeadIT za prikazani ligand napovesta zelo podobno konformacijo in pozo v vezavnem mestu. Pri ligandu, sidranem s programom LeadIT opazimo dve vodikovi vezi s treoninom (THR) 1459.



*Slika 10 - Prikaz sidranja z vsemi tremi programi v prvo zaprto konformacijo proteina. Vodikove vezi med ligandom in proteinom so prikazane z zelenimi črtkanimi vezmi.*

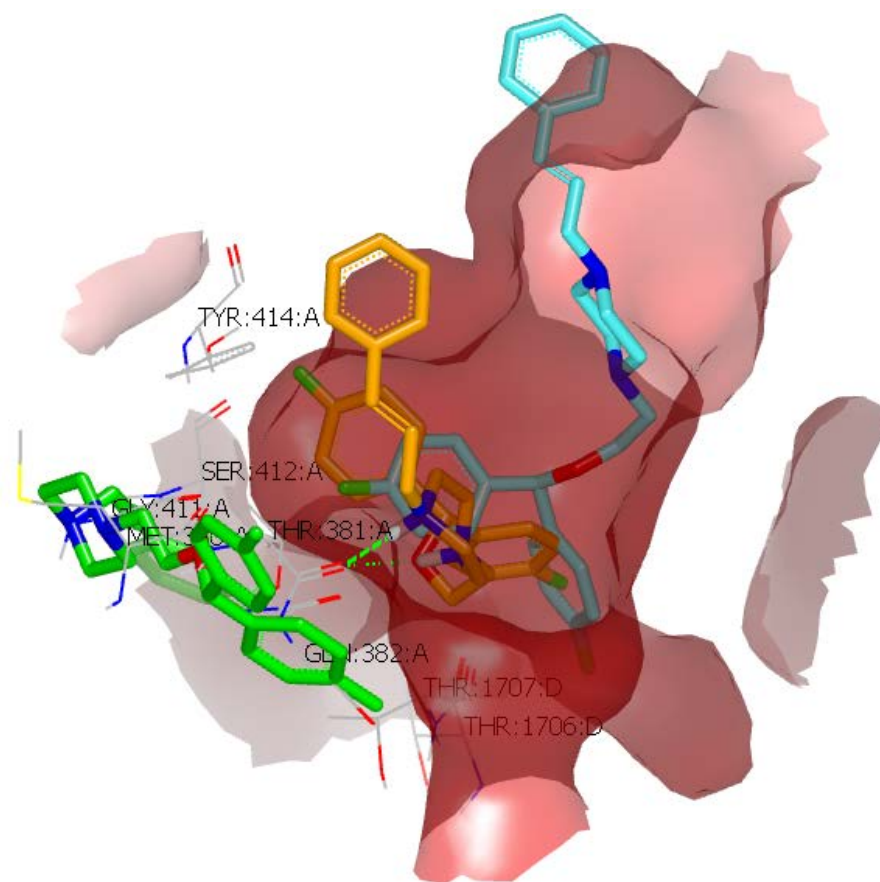
Pri sidranju v drugo konformacijo zaprtega proteina smo, podobno kot pri sidranju v prvo konformacijo, v programih spreminjali veliko nastavitev in za predstavitev rezultatov izbrali najboljša sidranja z vsakim programom. Program FRED je za vse ligande napovedal slabo vezavo, medtem ko so rezultati, pridobljeni s sidranjem s programoma LeadIT in eLEA3D,

podobni kot pri sidranju v prvo konformacijo. Spletni program eLEA3D ni uspel sidrati večine ligandov.

*Preglednica 12 - Rezultati sidranja za drugo zaprto konformacijo proteina.*

Eksperimentalno			FRED		LeadIT		eLEA3D		
Ligand	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	Razred	Vrednost Razred	abs. razlika	Vrednost Razred	abs. razlika	Vrednost Razred	abs. razlika	
XEN000013341	30,0	0	-5,66	0	-11,94	1	0,00	0	0
XEN000016251	30,0	0	-6,09	0	-22,17	2	0,00	0	0
XEN000016507	30,0	0	-2,71	0	-13,17	1	71,80	2	2
XEN000017861	6,2	1	-6,42	0	-20,07	2	0,00	0	1
XEN000017911	30,0	0	-5,92	0	-22,44	2	45,40	0	0
XEN000018053	7,5	1	-6,42	0	-14,38	1	0,00	0	1
XEN000018671	8,2	1	-7,57	0	-15,93	1	0,00	0	1
XEN000018679	8,0	1	-6,16	0	-15,70	1	74,30	2	1
XEN000018687	7,5	1	-8,12	0	-19,46	2	63,50	1	0
XEN000018699	9,0	1	-6,35	0	-4,62	0	0,00	0	1
XEN000024117	30,0	0	-5,52	0	-15,32	1	45,60	0	0
XEN000024279	9,5	1	-6,25	0	-11,34	1	62,10	1	0
XEN000027166	28,0	0	-6,15	0	-16,02	1	0,00	0	0
XEN000030330	30,0	0	-6,26	0	-15,50	1	0,00	0	0
XEN000030459	30,0	0	-3,33	0	-15,61	1	0,00	0	0
vsota absolutnih razlik				7		13		7	

S programom VIDA smo vizualno pregledali rezultate (Slika 11). Z modro barvo je označen ligand, sidran s programom FRED, z oranžno ligand, sidran s programom LeadIT, in z zeleno ligand, sidran s programom eLEA3D. Pri ligandu, sidranim s programom LeadIT opazimo tvorbo vodikovih vezi s treoninom (THR) 381. Program eLEA3D je ligand 8 ponovno sidral izven predvidenega žepa vezave, vendar je tu vseeno viden v ozadju. Razlika je morda nastala zaradi nastavitve prevelikega vezavnega žepa ali pa zaradi drugačnega načina zaznavanja vezavnega žepa programa in drugačnega algoritma sidranja.



*Slika 11 - Prikaz sidranja z vsemi tremi programi v drugo zaprto konformacijo proteina. Vodikove vezi med ligandom in proteinom so prikazane z zelenimi črtkanimi vezmi.*



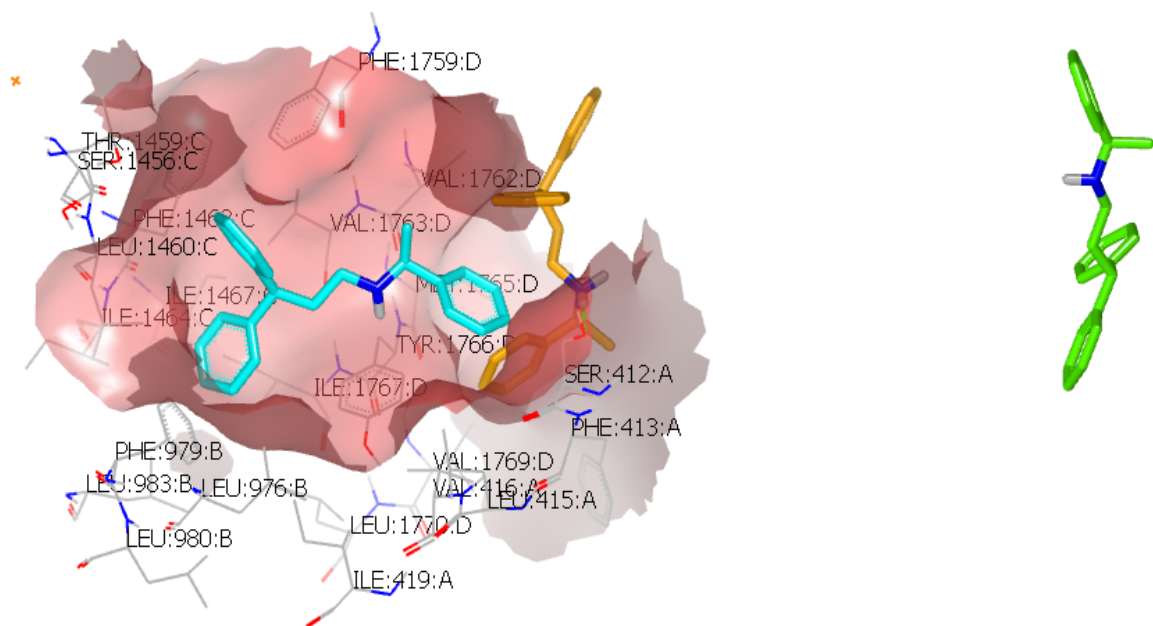
Pri sidranju v odprte konformacije proteina so eksperimentalni rezultati veliko bolj raznoliki. Glavna razlika med absolutnimi razlikami pri sidranjih v zaprte in odprte konformacije je, da so pri zaprtih konformacijah rezultati boljši pri programu FRED, pri odprtih pa pri programu LeadIT. Program eLEA3D je pri zaprtih konformacijah večino ligandov sidral zunaj predvidenega vezavnega mesta, pri odprtih konformacijah pa so, vsaj za nekatere ligande, rezultati bolj obetavni.

Eksperimentalno pridobljeni podatki o sidranju prvih dveh ligandov s programom LeadIT kažejo, da se liganda dobro sidrata v vezavno mesto (visoka vrednost cenilne funkcije), medtem ko je program FRED za ta dva liganda napovedal slabo vezavo (nizka vrednost cenilne funkcije). Prav tako enega izmed teh ligandov ni uspel sidrati program eLEA3D. Pri programu LeadIT so rezultati najbolj primerljivi z rezultati, pridobljenimi iz podjetja Xention.

Preglednica 13 - Rezultati sidranja v prvo odprto konformacijo proteina.

ligand	Ekperimentalno		FRED		LeadIT		eLEA3D				
	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	razred	vrednost	razred abs. razlika	vrednost	razred abs. razlika	vrednost	razred abs. razlika			
XEN0001334	2,9	2	-8,95	0	2	-11,39	1	1	0,00	0	2
XEN0001625	1,1	2	-8,87	0	2	-21,31	2	0	66,09	1	1
XEN0001650	21,9	0	-6,07	0	0	-8,70	0	0	76,27	2	2
XEN0001786	5,5	1	-10,01	1	0	-18,22	2	1	73,12	2	1
XEN0001791	6,5	1	-8,66	0	1	-19,54	2	1	50,25	1	0
XEN0001805	3,6	1	-7,62	0	1	-14,76	1	0	0,00	0	1
XEN0001867	2,5	2	-10,69	1	1	-12,26	1	1	71,57	2	0
XEN0001867	5,2	1	-8,23	0	1	-11,79	1	0	72,44	2	1
XEN0001868	5,5	1	-10,82	1	0	-11,55	1	0	63,17	1	0
XEN0001869	5,1	1	-10,36	1	0	-9,16	0	1	54,96	1	0
XEN0002411	4,5	1	-9,10	0	1	-17,42	2	1	55,03	1	0
XEN0002427	3,0	1	-11,24	1	0	-11,37	1	0	62,79	1	0
XEN0002716	12,4	0	-5,69	0	0	-11,49	1	1	38,90	0	0
XEN0003033	18,3	0	-7,93	0	0	-11,30	1	1	45,95	0	0
XEN0003045	7,0	1	-8,09	0	1	-13,61	1	0	0,00	0	1
vsota absolutnih razlik					10			8			9

Pri vizualnem pregledu rezultatov smo ugotovili, da program eLEA3D nekaterih ligandov ponovno ni sidral v predvideno vezavno mesto, kljub temu, da so rezultati po samem sidranju izgledali bolj primerljivi. Na spodnji sliki (Slika 12) je predstavljen primer vezave liganda 7 v prvo odprto konformacijo proteina. Ligand, označen z zeleno barvo, je sidran s programom eLEA3D in se ne nahaja znotraj žepa. Ligand, označen z modro barvo, je sidran s programom FRED, ligand oranžne barve pa s programom LeadIT. Pri ligandu sidranem s programom LeadIT opazimo tvorbo vodikove vezi s serinom (Ser) 412.



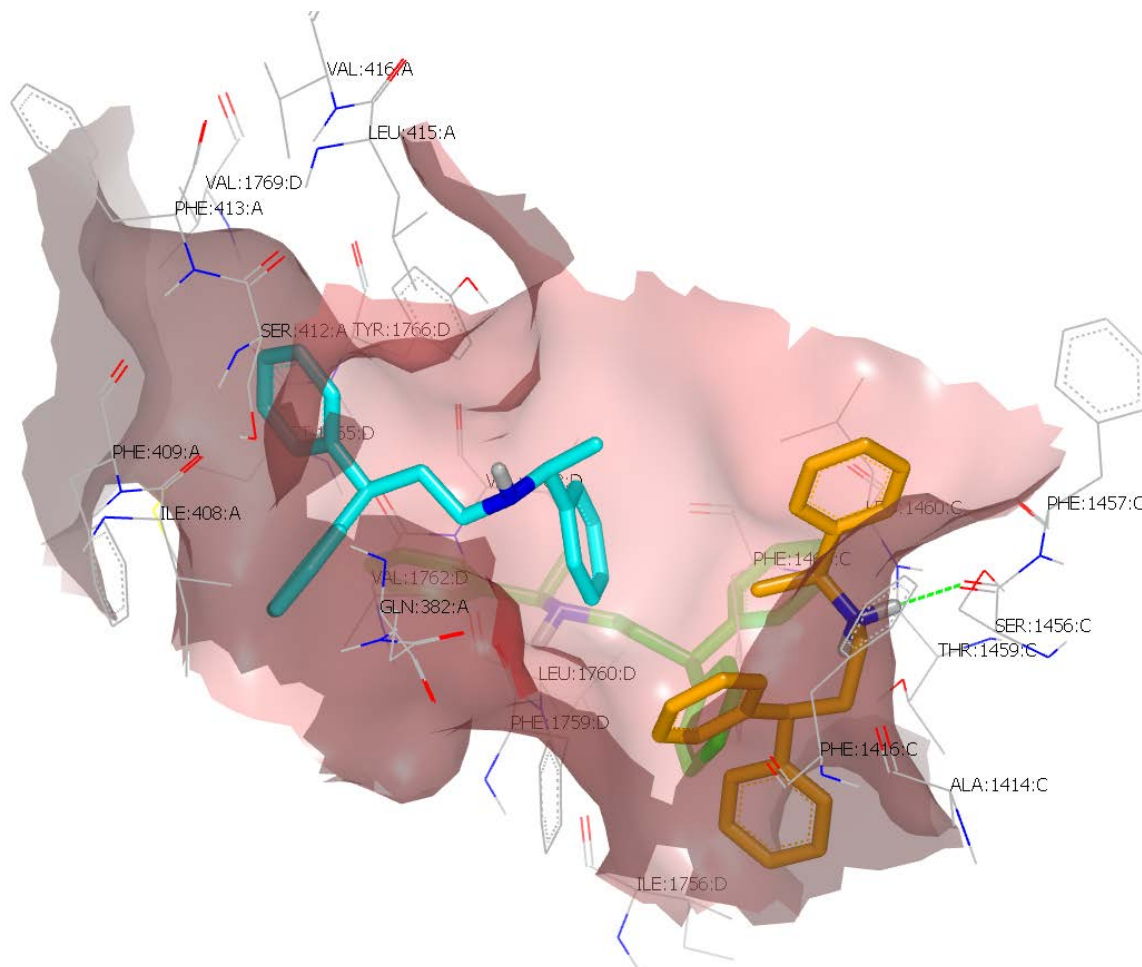
*Slika 12 - Prikaz sidranja z vsemi tremi programi v prvo odprto konformacijo proteina. Vodikove vezi med ligandom in proteinom so prikazane z zelenimi črtkanimi vezmi.*

Pri sidranju v drugo konformacijo odprtega proteina hNa<sub>v</sub>1.3 smo uporabili enake eksperimentalne podatke. Podobno kot pri prvi odprti konformaciji so tudi pri drugi rezultati najboljše pri programu LeadIT. Program FRED je drugi ligand sidral bolje kot prvič, vendar je vezavo prvega liganda še vedno ocenil kot slabo, čeprav nam eksperimentalni rezultati kažejo, da ima zelo dobro vezavo v vezavno mesto proteina. Program eLEA3D večine ligandov ni uspel sidrati.

Preglednica 14 - Rezultati sidranja v drugo odprto konformacijo proteina.

Ligand	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	razred	FRED		LeadIT		eLEA3D				
			vrednost	razred	abs. razlika	vrednost	razred	abs. razlika	vrednost	razred	abs. razlika
XEN00013341	2,9	2	-9,60	0	2	-11,72	1	1	0,00	0	2
XEN00016251	1,1	2	-10,08	1	1	-16,94	1	1	0,00	0	2
XEN00016507	21,9	0	-6,42	0	0	-7,22	0	0	0,00	0	0
XEN00017861	5,5	1	-8,88	0	1	-16,05	1	0	64,48	1	0
XEN00017911	6,5	1	-7,35	0	1	-17,05	2	1	46,32	0	1
XEN00018053	3,6	1	-7,65	0	1	-12,89	1	0	0,00	0	1
XEN00018671	2,5	2	-10,37	1	1	-15,31	1	1	71,98	2	0
XEN00018679	5,2	1	-8,51	0	1	-14,81	1	0	67,87	1	0
XEN00018687	5,5	1	-6,99	0	1	-10,04	1	0	0,00	0	1
XEN00018699	5,1	1	-10,07	1	0	-7,26	0	1	0,00	0	1
XEN00024117	4,5	1	-7,83	0	1	-14,89	1	0	47,57	0	1
XEN00024279	3,0	1	-9,29	0	1	-15,32	1	0	0,00	0	1
XEN00027166	12,4	0	-6,21	0	0	-13,19	1	1	0,00	0	0
XEN00030330	18,3	0	-8,61	0	0	-11,17	1	1	45,85	0	0
XEN00030459	7,0	1	-7,75	0	1	-8,29	0	1	0,00	0	1
vsota absolutnih razlik					12			8			11

Vizualno je predstavljen primer sidranja liganda 7 (Slika 13). Z oranžno barvo je predstavljen ligand, sidran s programom LeadIT, z modro ligand, sidran s programom FRED, in z zeleno ligand, sidran s programom eLEA3D. Ligandi so vsi vezani v zelo različna mesta v žepu, kar je lahko posledica različnih algoritmov, ki jih programi uporabljajo za sidranje, ali pa različnih uporabljenih nastavitev, ki so vsaj delno odvisne od možnosti programa. Pri ligandu, sidranem s programom LeadIT lahko opazimo tvorbo vodikove vezi s serinom (SER) 1456.



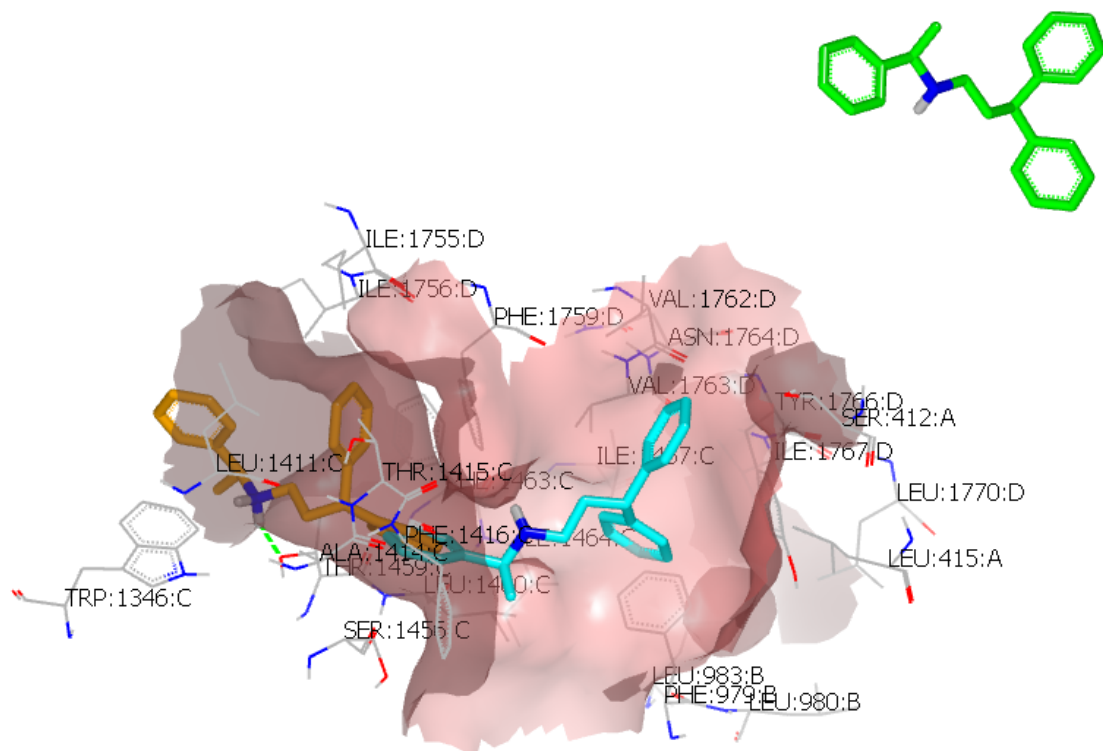
*Slika 13 - Prikaz sidranja z vsemi tremi programi v drugo odprto konformacijo proteina. Vodikove vezi med ligandom in proteinom so prikazane z zelenimi črtkanimi vezmi.*

Pri sidranju v zadnjo odprto konformacijo proteina je rezultate, ki so najbolj primerljivi z eksperimentalnimi jakostmi inhibicije odprte konformacije kanala, generiral program LeadIT. Program FRED je vezave vseh ligandov ocenil kot slabe, program eLEA3D pa ni uspel sidrati vseh ligandov.

Preglednica 15 - Rezultati sidranja v zadnjo odprto konformacijo proteina.

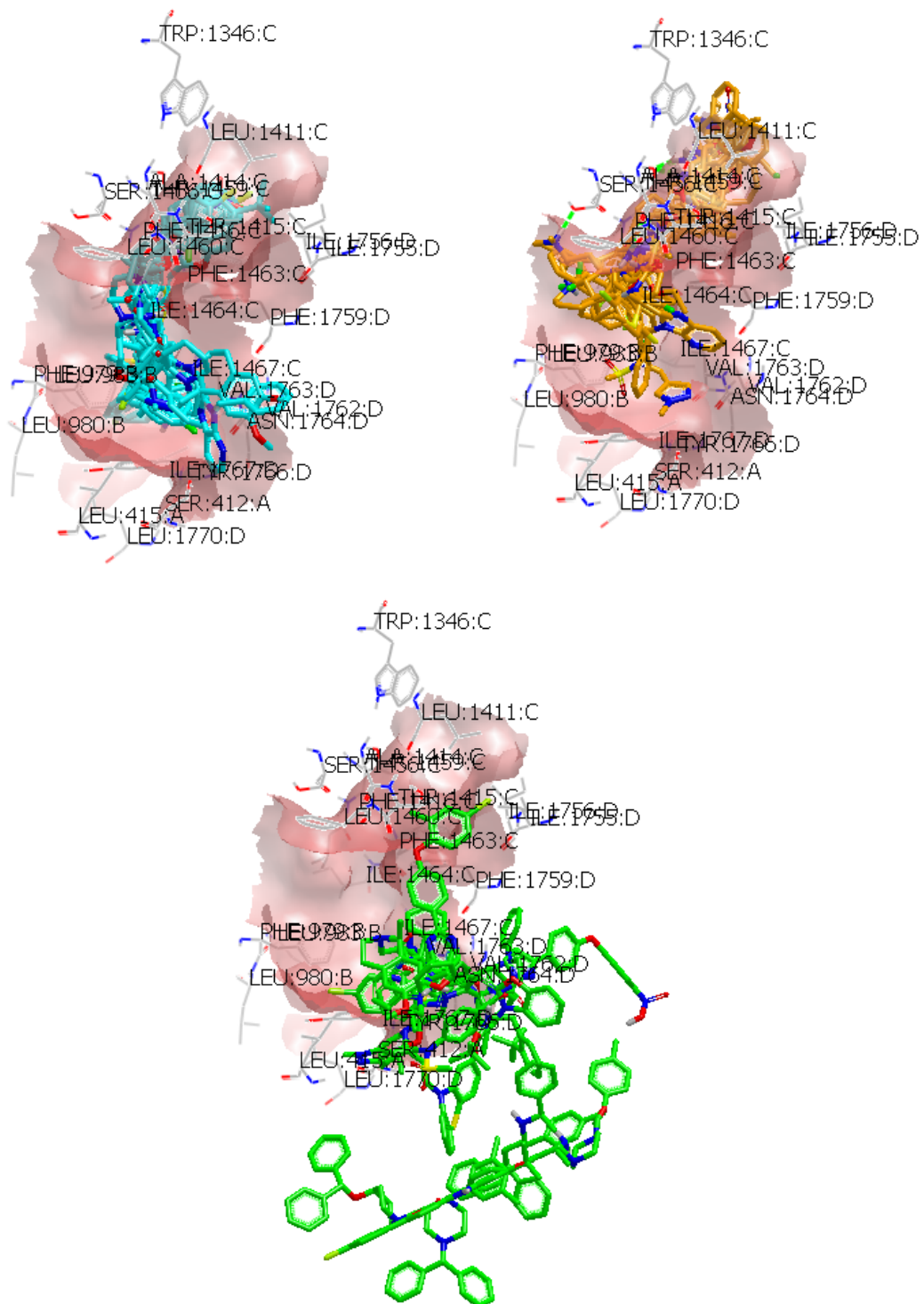
	Ekspimentalno	FRED	LeadIT	eLEA3D	
ligand	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	razred	vrednost razred abs. razlika	vrednost razred abs. razlika	
XEN00013341	2,9	2	-6,78	0	2
XEN00016251	1,1	2	-8,10	0	2
XEN00016507	21,9	0	-4,42	0	2
XEN00017861	5,5	1	-7,35	0	1
XEN00017911	6,5	1	-7,01	0	0
XEN00018053	3,6	1	-7,44	0	1
XEN00018671	2,5	2	-7,13	0	0
XEN00018679	5,2	1	-8,62	0	1
XEN00018687	5,5	1	-7,09	0	1
XEN00018699	5,1	1	-6,09	0	1
XEN00024117	4,5	1	-7,08	0	0
XEN00024279	3,0	1	-8,78	0	0
XEN00027166	12,4	0	-4,01	0	1
XEN00030330	18,3	0	-6,97	0	1
XEN00030459	7,0	1	-5,52	0	1
vsota absolutnih razlik			15	9	10

Na spodnji sliki vidimo vizualni prikaz sidranja liganda 7 v vezavno mesto proteina hNav<sub>v</sub>1.3 (Slika 14). Z modro barvo je označen ligand, ki smo ga sidrali s programom FRED, z oranžno ligand, ki smo ga sidrali s programom LeadIT, in z zeleno ligand, sidran s programom eLEA3D. Ligand, sidran s programom eLEA3D, se nahaja izven predvidenega žepa vezave. Ligand, sidran z drugim dvema programoma, je prav tako na zelo različnih mestih v vezavnem žepu. Pri ligandu, ki je sidran s programom LeadIT, opazimo tvorbo vodikove vezi s treoninom (THR) 1459.



*Slika 14 - Prikaz sidranja z vsemi tremi programi v zadnjo odprto konformacijo proteina. Vodikove vezi med ligandom in proteinom so prikazane z zelenimi črtkanimi vezmi.*

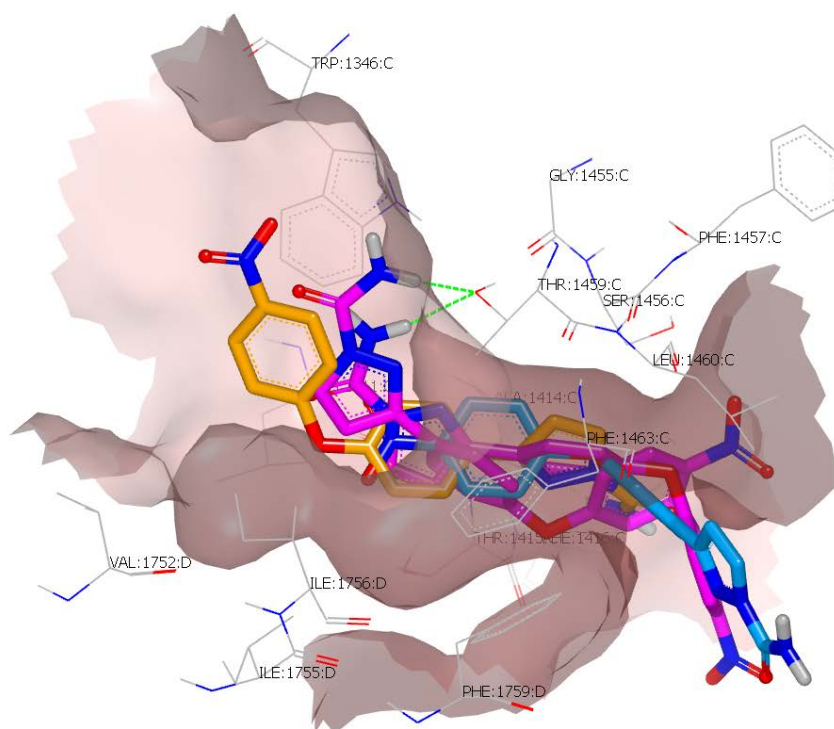
Na primeru zadnje odprte konformacije proteina smo vizualno primerjali tudi, kam je program vezal večino ligandov (Slika 15). Iz spodnjih slik vidimo, da so programi ligande vezali v zelo različna mesta proteina. Z modro barvo so predstavljeni ligandi, sidrani s programom FRED, z oranžno ligandi, sidrani s programom LeadIT, in z zeleno ligandi, sidrani s programom eLEA3D. Program eLEA3D je večino ligandov sidral izven predvidenega vezavnega mesta.



Slika 15 - Primerjava sidranj vseh ligandov z vsakim od programov.



Vizualno smo pregledali tudi rezultate sidranja desetih najboljših poz istega liganda s programom LeadIT v isto konformacijo proteina. Primerjali smo jih s sidranjem programa FRED in eLEA3D v isto konformacijo proteina. Na spodnji sliki (Slika 16) je prikazana najboljša poza liganda 2 (XEN00016251) s programom LeadIT v oranžni barvi. Pri sidranju desetih poz smo dobili tri različne skupine poz. Ena skupina poz je bila skoraj identična najboljši, ostali dve skupini poz pa predstavljata liganda v rožnati barvi. V modri barvi je dodana poza liganda, sidranega s programom FRED, ligand sidran s programom eLEA3D na sliki ni viden, ker ga je program sidral izven vezavnega mesta.



*Slika 16 - Prikaz več poz, pridobljenih s sidranjem s programom LeadIT.*

## 5. SKLEP

Napetostno odvisni natrijevi kanali so zelo pomembni za nastanek akcijskega potenciala in s tem prevajanja živčnih impulzov v vzdražnih celicah. Zaviralce teh kanalov uporabljamo za zdravljenje različnih bolezni in patoloških stanj, med drugim epilepsije, kronične bolečine in motenj srčnega ritma. Izoforna  $\text{Na}_v1.3$  se najpogosteje izraža v perifernem in centralnem živčevju. Zaviralce te izoforne uporabljamo za zdravljenje kronične bolečine, ker pa so si izoforne med seboj zelo podobne, zelo težko dosežemo selektivnost in zato stremimo k iskanju novih učinkovin.

Pri iskanju novih učinkovin lahko uporabljamo različne metode. Ena od njih je tudi računalniško sidranje molekul v vezavno mesto proteina. Da bi za to izbrali pravi program, lahko najprej v protein sidramo molekule z že znano aktivnostjo in s tem preverimo ustreznost programa za naše sidranje. Namen magistrske naloge je bil raziskati, kateri od programov, ki smo jih uporabili za sidranje ligandov v natrijev kanal  $\text{hNa}_v1.3$ , najprilneje napove vezavo izbranih ligandov v protein.

S tremi različnimi programi smo skušali čim bolje napovedati vezavo testnih molekul v različne zaprte in odprte konformacije kanala  $\text{hNa}_v1.3$ . Vsak od programov deluje po različnem algoritmu sidranja, različno pa imajo tudi cenilno funkcijo. Rezultate smo primerjali z eksperimentalnimi rezultati, pridobljenimi iz podjetja Xention, in med seboj. Prav tako smo vizualno pregledali sidranja molekul v vezavno mesto in primerjali sidranja različnih programov.

Rezultati so bili zelo odvisni od nastavitvev, ki smo jih uporabili. Skušali smo upoštevati čim več smiselnih nastavitvev, zagotovo pa nam ni uspelo zajeti vsega, zato bi pri drugih nastavitvah lahko dobili povsem druge rezultate. Pri sidranju s programoma FRED in LeadIT smo dobili dokaj primerljive rezultate, če gledamo le številčne vrednosti. Pri vizualnem pregledu vidimo, da so nekateri ligandi sidrani v podobnih, drugi pa v povsem različnih pozah v vezavnem mestu.

Rezultati, ki smo jih dobili, so zaradi specifičnih lastnosti proteinov in njihovih vezavnih mest pomembni le za naš protein in morda za nekaj zelo sorodnih. Pri odprti konformaciji smo najboljše rezultate dobili s sidranjem s programom LeadIT, pri zaprti konformaciji pa s

sidranjem s programom FRED. Rezultati pridobljeni s programom eLEA3D niso primerljivi z rezultati drugih dveh programov, ker ligandi v glavnem niso sidrani znotraj vezavnega mesta. Da pa bi potrdili ali so dobljene vezavne konformacije relevantne, bi bilo potrebno določiti vezavo teh ligandov v Nav1.3 s pomočjo rentgenske kristalografije. Na ta način bi potrdili ali ovrgli dobljene rezultate molekulskega sidranja.

Pri nadaljnjem iskanju novih zaviralcev napetostno odvisnega natrijevega kanala Nav1.3 bi se izmed teh petnajstih ligandov osredotočili na šest ligandov, ki naj bi izkazovali dobro afiniteto do vezavnega mesta glede na pridobljene podatke IC<sub>50</sub>. To so ligandi 1 (amitriptilin), 2, 6 (tioridazin), 7, 11 in 12.

## VIRI IN LITERATURA

1. Furini S., Domene C.: On conduction in a Bacterial Sodium Channel. *PLoS Comput Biol.* 8(4), 2012, e1002476.
2. Barber A. F., Carnevale V., Raju S. G., Amaral C., Treptow W., Klein M. L.: Hinge-bending motions in the pore domain of a bacterial voltage-gated sodium channel. *Biochim Biophys Acta.* 1818(9), 2012, str. 2120-2125.
3. Dib-Hajj S. D., Yang Y., Black J. A., Waxman S. G. The Nav1.7 sodium channel: From molecule to man. *Nat rev.* 14, 2013, str. 49-62.
4. Ruiz L. M., Kraus L. R. Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology and Clinical Indication. *J Med Chem.* 58(18), 2015, str. 7093-7118.
5. Tomašič T., Hartzoulakis B., Zidar N., Chan F., Kirby W. R., Madge J. D., Peigneur S., Tytgat J., Kikelj D. Ligand- and Structure-Based Virtual Screening for Clathrocin-Derived Human Voltage-Gated Sodium Channel Modulators. *J Chem Inf Model.* 53(12), 2013, str. 3223-3232.
6. Amaral L. Thioridazine: an Old Neuroleptic effective against Totally Drug Resistant Tuberculosis. *Acta Med Port.* 25, 2012, str. 118-121.
7. Bagal K. S., Chapman L. M., Marron E. B., Prime R., Storer R. I., Swain A. N. Recent progress in sodium channel modulators for pain. *Bioorganic Med Chem Lett.* 24, 2014, str. 3690-3699.
8. Namadurai S., Yereddi N. R., Cusdin F. S., Huang C. L., Chirgadze D. Y., Jackson A. P. A new look at sodium channel  $\beta$  subunits. *Open Biol.* 5(1), 2015, 140192.
9. Naylor E. C., Bagnieris C., DeCaen G. P., Sula A., Scaglione A., Clapham E. D., Wallace B. A. Molecular basis of ion permeability in a voltage gated sodium channel. *EMBO J.* 35, 2016, str. 820-830.
10. Štuhec M. Optimizacija zdravljenja z antiepileptičnimi zdravili glede na neželene učinke zdravil: kako pristopiti. *Farm vestn.* 66, 2015, str. 28-34.
11. Urbanc M., Locatelli I. Zdravila za zdravljenje nevropatske bolečine. *Farm vest.* 67, 2016, str. 325-332.

12. O'Neill E., Kwok B., Day S. J., Connor J. T., Harkin A. Amitriptyline protects against TNF- $\alpha$ -induced atrophy and reduction in synaptic markers via a Trk-dependent mechanism. *Pharmacol Res Perspect.* 4(2), 2016:e00195.
13. Zuliani V., Amori L., Rivara M. (2011) Advances in Design and Development of Sodium Channel Blockers. In: Gupta S. (eds) Ion Channels and Their Inhibitors. Springer, Berlin, Heidelberg. str. 79-115
14. Wang G. K., Russel C., Wang S. Mexiletine block of wild-type and inactivation-deficient human skeletal muscle hNav1.4 Na<sup>+</sup> channels. *J Physiol.* 554(3), 2004, str. 621-633
15. Fuentes I. M., Christianson J. A. Ion channels, ion channel receptors, and visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 28(11). 2016, str. 1613-1618.
16. Ning M., Zhou Y., Chen G., Mei X. Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation of Vinpocetine Elementary Osmotic Pump System. *Adv in Pharmacol Sci.* 2011.
17. Sazal P., Prakash A., Modi M., Medhi B. Role in vinpocetine in cerebrovascular diseases. *Pharmacol Rep.* 63(3), 2011, str. 618-628.
18. Kitchen B. D., Decornez H., Furr R. J., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev.* 3, 2004, str. 935-949.
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425711/>.
20. Lyne D. P. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov Today.* 7, 2002, str. 1048-1055.
21. Schmidt T., Bergner A., Schwede T. Modelling three-dimensional protein structures for applications in drug design. *Drug Discov Today.* 19(7), 2014, str. 890-897.
22. A., Fiser. Template-Based Protein Structure Modeling. *Methods Mol Biol.* 637, 2010, str. 73-94.
23. Payandeh J., Schuer T., Zheng N., Catterall W.A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature.* 475, 2011, str. 353-358.
24. Amer A., Youxing J. High-resolution structure of the open NaK channel. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 2009, str. 30-34.

25. McGann M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J Chem Inf Model.* 51, 2011, str. 578-596.
26. OEDOCKING 3.2.0.2.: OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM. <http://www.eyesopen.com>.
27. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databak and the Cambridge Structural Database. *J Chem Inf Model.* 50, 2010, str. 572-584.
28. Hawkins P. C. D., Skillman A. G., Warren G. L., Ellingson B. A., Stahl M. T. OMEGA 3.0.0.1. <http://www.eyesopen.com>.
29. <https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred.html>.
30. [https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred\\_and\\_hybrid\\_theory.html#theory-algorithm-chemgauss3](https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred_and_hybrid_theory.html#theory-algorithm-chemgauss3).
31. <https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred.html>.
32. [https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred\\_and\\_hybrid\\_theory.html#chemgauss3](https://docs.eyesopen.com/oedocking/fred_and_hybrid_theory.html#chemgauss3).
33. Rarey M., Kramer B., Lengauer T. and Klebe G. Fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol.* 261 (3), Aug 23 1996, str. 470-489.
34. <https://www.biosolveit.de/SeeSAR/science.html>.
35. [https://www.biosolveit.de/FlexX/download/flexx\\_brochure.pdf](https://www.biosolveit.de/FlexX/download/flexx_brochure.pdf).
36. Chaput L, Mouawad L. Efficient conformational sampling and weak scoring in docking programs? Strategy of the wisdom of crowds. *J Cheminform.* 9(1), 2017.
37. <https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/support/case/?caseid=5d1a2fc0-c93a-49c3-a8e2-f95c472dcff0>.
38. <http://chemoinfo.ipmc.cnrs.fr/>.
39. e-Lea3d: a computational-aided drug design web server. *Nucleic Acids Res.* 38 (Web Server issue), 2010, str. W615-W621.
40. Lipking G. M., Fozzard H. A. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol Pharm.* 68, 2005, str. 1611-1622.