

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**UROŠ HROVAT**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJA**

**LJUBLJANA, 2012**

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**UROŠ HROVAT**

**DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJA**

**ODKRIVANJE NOVIH ZAVIRALCEV  $\beta$ -KETOACIL-ACP  
REDUKTAZE (FABG) IZ *ESCHERICHIA COLI* Z VIRTUALNIM  
REŠETANJEM**

**DISCOVERY OF NOVEL  $\beta$ -KETOACYL-ACP REDUCTASE (FABG)  
INHIBITORS FROM *ESCHERICHIA COLI* USING VIRTUAL HIGH-  
THROUGHPUT SCREENING**

**LJUBLJANA, 2012**

Diplomsko naložbo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Sama Turka, mag. farm.

### **Zahvala:**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in somentorju asist. dr. Samu Turku, mag. farm. za pomoč, svetovanje in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvaljujem se Borisu Brusu, mag. farm., da me je navdušil za izdelavo diplomske naloge in za vso pomoč pri delu.

Hvala vsem kolegom in kolegicam s Fakultete za farmacijo, s katerimi sem preživel nepozabna študentska leta.

Skozi celoten študij sem krmaril med študijem in treniranjem akrobaškega zabijanja pri skupini Dunking Devils. Fantje, hvala za vse lepe trenutke na treningih in neštetih nastopih po svetu.

Hvala vsem prijateljem in prijateljicam, da me sprejemate takšnega kot sem.

Posebej se zahvaljujem svoji družini, ki mi vedno stoji ob strani.

Ana, hvala, da prinašaš sonce v moje dni in iz njih odganjaš sence.

### **Izjava:**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Sama Turka, mag. farm.

Uroš Hrovat

Ljubljana, 2012

# KAZALO VSEBINE

<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Biosinteza bakterijskih maščobnih kislin .....	3
1.2. $\beta$ -ketoacil reduktaza (FabG) iz bakterije <i>E. Coli</i> .....	5
1.2.1. Znani inhibitorji na (FabG) .....	7
1.3. Iskanje novih zdravilnih učinkovin z računalniškimi metodami .....	8
1.3.1. Različni formati spojin .....	9
1.3.2. Filtriranje in priprava knjižnice .....	9
1.3.3. Virtualno rešetanje na osnovi liganda .....	11
1.3.4. Virtualno rešetanje na osnovi tarče .....	13
1.3.5. Vizualizacija spojin in makromolekul .....	17
<b>2 NAČRT ZA DELO .....</b>	<b>18</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>18</b>
3.1. Računalniške metode .....	18
3.2. Spektrofotometrično določanje inhibitornih lastnosti .....	19
<b>4 POSTOPEK DELA .....</b>	<b>19</b>
4.1. Priprava knjižnice spojin za sidranje .....	19
4.2. Priprava proteina in določitev aktivnega mesta .....	21
4.3. Prvo sidranje spojin v aktivno mesto encima FabG .....	22
4.4. Drugo sidranje spojin v aktivno mesto FabG .....	23
4.5. Tretje sidranje spojin v aktivno mesto FabG .....	23
4.6. Spektrofotometrično določanje inhibitorne aktivnosti spojin na FabG .....	24
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>26</b>
5.1. Rezultati načrtovanja knjižnice in sidranja .....	26
5.1.1. Rezultati prvega <i>in vitro</i> testiranja na encimu FabG .....	28
5.1.2. Rezultati drugega <i>in vitro</i> testiranja na encimu FabG .....	31
5.1.3. Komentar rezultatov testiranja spojin .....	33
5.1.4. Določanje čistosti in istovetnosti spojin .....	33
<b>6 SKLEP .....</b>	<b>35</b>
<b>7 LITERATURA.....</b>	<b>36</b>

# KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Dinamika odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin. ....	1
<b>Slika 2:</b> Potek reakcij v ciklu sinteze maščobnih kislin pri bakterijah.....	4
<b>Slika 3:</b> Encim FabG z vezanim kofaktorjem NADPH (rdeče). ....	5
<b>Slika 4:</b> Delovanje programa ROCS. ....	12
<b>Slika 5:</b> Algoritem programa FRED pri sidranju v aktivno mesto proteina. ....	17
<b>Slika 6:</b> Pretvorba triklosana v predlogo za rešetanje na podlagi oblike in volumna s programom ROCS. ....	20
<b>Slika 7:</b> Encim FabG z vezanim kofaktorjem NADPH (rdeče) in območjem, ki smo ga določili za sidranje molekul s programom FRED (modro).....	21
<b>Slika 8:</b> Vezavno območje pri prvem sidranju v FabG, ki smo ga določili v programu FRED. Modra barva predstavlja zunanj prostornino, zelena pa notranj prostornino vezavnega mesta. Vezan koencim NADPH je označen z vijolično barvo. ....	22
<b>Slika 9:</b> Vezavno mesto za tretje sidranje v encim FabG. Modra barva predstavlja zunanj prostornino, zelena pa notranj prostornino vezavnega mesta. Vezan koencim NADPH je označen z vijolično barvo. ....	24
<b>Slika 10:</b> Primer grafa absorbance v odvisnosti od časa pri naših <i>in vitro</i> poskusih. Z rdečo je označeno linearno območje, ki smo ga upoštevali za izračun hitrosti razpada substrata. ....	26
<b>Slika 11:</b> Pozicija nikotinamidnega dela NADPH in PHE 183 v aktivnem mestu FabG. Rumena prekinjena črta prikazuje razdaljo med skupinama. ....	27
<b>Slika 12:</b> Razporeditev skupin, ki tvorijo vodikove vezi s testiranimi spojinami v aktivnem mestu FabG. Z modro barvo je označen kofaktor NADPH, z označenimi aktivnimi funkcionalnimi skupinami (sladkorna –OH rdeča barva, fosfatni skupini rumena barva). ....	28
<b>Slika 13:</b> Najbolj aktivna spojina prvega <i>in vitro</i> testiranja, spojina <u>11</u> (vijolično), sidrana v aktivno mesto encima FabG. Vodikove vezi so prikazane z rumenimi prekinjenimi črtami. ....	31
<b>Slika 14:</b> Najbolj aktivna spojina drugega <i>in vitro</i> testiranj, spojina <u>22</u> (svetlomodra barva), sidrana v aktivno mesto FabG. Vodikove vezi so prikazane s rumenimi prekinjenimi črtami. ....	33

# KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Znani inhibitorji FabG. ....	7
<b>Preglednica II:</b> Različni kemijski zapisi za molekulo triklosana .....	9
<b>Preglednica III:</b> Najboljši zadetki prvega <i>in vitro</i> testiranja na encimu FabG iz <i>E. Coli</i> . ....	29
<b>Preglednica IV:</b> Primerjava <i>in vitro</i> aktivnosti spojin (3-4, 6-9).....	30
<b>Preglednica V:</b> Najboljši zadetki drugega <i>in vitro</i> testiranja na encimu FabG iz <i>E. Coli</i> .....	32

## **POVZETEK**

Zdravljenje bakterijskih infekcij s protibakterijskimi učinkovinami, ki se je začelo v tridesetih letih prejšnjega stoletja, je bilo eno največjih uspehov dvajsetega stoletja. Zlatim časom razvoja novih učinkovin pa je sledilo zatišje, saj so bile od sedemdesetih let naprej odkrite samo 4 nove skupine protibakterijskih učinkovin. Pojav rezistence na praktično vse protibakterijske učinkovine nas sili v razvoj novih spojin, ki bodo delovale na nove tarče. Ena od takih tarč je encim  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaza (FabG), ki je udeležen pri bakterijskem ciklu maščobnih kislin. Encim pri sesalcih nima homologa, med bakterijami pa je visoko ohranjen in je zato idealna tarča za razvoj novih selektivno toksičnih protibakterijskih učinkovin. Za svoje delovanje potrebuje kofaktor NADPH in je edini znani encim v ciklu maščobnih kislin, ki katalizira redukcijo keto do hidroksi skupine.

V preteklosti je temeljil razvoj novih zdravilnih učinkovin za empiričnih testiranjih, dandanes pa se usmerja v racionalno načrtovanje spojin. Z virtualnim rešetanjem knjižnic spojin lahko obogatimo knjižnico in identificiramo zadetke. Z razvojem programske opreme, rentgenske kristalografije in razrešenimi strukturami tarčnih proteinov, predstavljajo računalniške metode odlično orodje za načrtovanje spojin.

Začetno knjižnico z 10.600.000 spojinami smo filtrirali z enostavnimi deskriptorji in nato s programom ROCS izvedli rešetanje na osnovi oblike in volumna molekule triklosana. Najboljše zadetke smo v treh ločenih sidranjih s programom FRED sidrali v aktivno mesto FabG. Pri tretjem smo s programom NAMD izvedli tudi minimalizacijo tarčnega encima. Vizualno smo pregledali 100 najboljših zadetkov vsakega sidranja in naročili 38 spojin, ki smo jim določili procent inhibicije encima. 6 spojin je v mikromolarni koncentraciji izkazovalo več kot 20 procentno inhibicijo. Pridobljene spojine so imele nizko molekulsko maso, kar omogoča nadaljnjo optimizacijo. Na podlagi rezultatov inhibitorne aktivnosti testiranih spojin smo postavili osnovne strukturne zahteve za zaviralce FabG, določili način vezave v aktivno mesto FabG in identificirali funkcionalne skupine, ki sodelujejo pri vezavi.

Določili smo 3 nove skupine aktivnih spojin na encimu FabG in sicer derivate indol-3-ojetne kisline, indol-3-karboksilne kisline in 4,5-dihidro-2H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-ola. Pri slednjih smo ugotovili, da hidroksi ali alkiloksi skupina na para mestu fenilnega obroča vpliva na inhibitorno aktivnost.

## ABSTRACT

Antibacterial chemotherapy, which began in the nineteen thirties, was one of the greatest advances of the twentieth century. The golden time of development of new antibacterials was followed by a lull and there were only 4 new groups of antibacterial agents developed after seventies. The emergence of resistance to virtually all antibacterial agents is forcing the development of new compounds that will work on new targets. One of such candidates is  $\beta$ -ketoacil-ACP reductase (FabG), an enzyme of the bacterial fatty acids cycle. The enzyme does not have a homologue in mammals, however it is highly conserved among bacteria and is therefore an ideal target for the new selective toxic antibacterial compounds. It requires a cofactor NADPH for its actions and it is the only known enzyme of the bacterial fatty acids cycle that catalyzes the reduction of the keto to the hydroxy group. In the past the development of new therapeutic agents was based on the empirical testing, whereas today the focus lies on the rational design of compounds. With virtual screening of compound libraries we are able to enrich the library and identify hits. The development of software, X-ray crystallography and new enzyme structures have enabled computational methods to become perfect tools for drug development. The initial library of 10.600.000 compounds was filtered with simple descriptors and the results were used for ligand based virtual screening with the program ROCS. A molecule of triclosan was used as a template for the comparison based on shape and volume. The best results were docked in the active site of FabG in three separate trials using program FRED. In the third docking the program NAMD was used to minimize the target enzyme. The top 100 hits of each docking were visually examined and 38 compounds were ordered for which we determined the percentage of inhibition. In micromolar concentrations 6 compounds demonstrated more than 20% inhibition. These compounds had a low molecular weight, making them suitable for further optimization. Basic structural requirements for FabG inhibitors and the binding mode in the active site of FabG were set up and the functional groups involved in binding were identified. Three new groups of active compounds on the enzyme FabG were identified, derivatives of indole-3-acetic acid, indole-3-carboxylic acid and 4,5-dihydro-2H-pyrazolo [3,4-b] pyridine-5-ol. In the latter, we found out that alkyloxy or hydroxy group at the para position of the phenyl ring positively affect the inhibitory activity.

## SEZNAM OKRAJŠAV

---

2D	Dvodimenzionalen
3D	Tridimenzionalen
Å	Angstrom
ACP	Acyl carrier protein; Acil prenašajoči protein
ADME	Absorpcija, Distribucija, Metabolizem, Ekskrecija
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginska kislina
CoA	Acetil koencim A
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfoksid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGCG	Epigalokatehin galat
EU-INTAFAR	Inhibition of New Targets for Fighting Antibiotic Resistance
Fab	Fatty acid biosynthesis; Biosinteza maščobnih kislin
Fab (A, Z)	β-hidroksi acil-ACP dehidrataza
Fab (B, F)	β-ketoacil-ACP sintetaza I
Fab (I, K, L)	Enoil-ACL reduktaza
FabG	β-ketoacil-ACP reduktaza
FAS I	Fatty acid synthase; sintaza (cikel maščobnih kislin - sesalci)
FAS II	Fatty acid synthase; sintaza (cikel maščobnih kislin - bakterije)
G-	Gram negativna bakterija
Gln	Glutamin
H-vez	Vodikova vez
HIV	Human immunodeficiency virus; Virus humane imunske pomanjkljivosti
HTS	High throughput screening; Rešetanje visokih zmogljivosti
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry; Mednarodna zveza za čisto in uporabo kemijo
kDa	KiloDalton
LogP	Porazdelitveni koeficient
Lys	Lizin

---

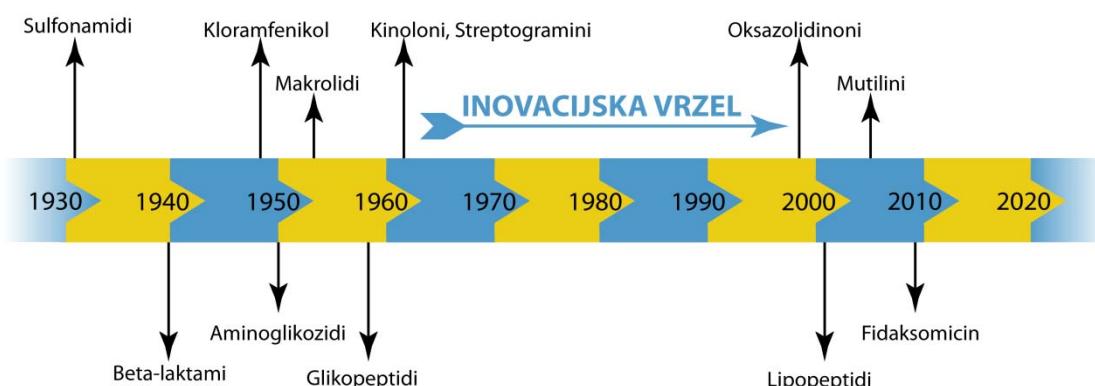
---

MDR	Muti drug resistant; Odporen na več vrst zdravil
MDR-TB	Multi drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; Na več vrst zdravil odporni sevi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MM	Molekulska masa
MRSA	Na meticilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
NAD(H)	Nikotinamid adenin dinukleotid
NADP(H)	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NCI	National Cancer Institute; Državni inštitut za zdravljenje rakavih obolenj
NMR	Nuklearna magnetna resonanca
NPV	Net Present Value; Neto sedanja vrednost
PDB	Protein database; Banka proteinskih struktur
PDR	Pandrug-resistant; Odporen na večino zdravil
PGG	1,2,3,4,6-penta-O-galoil-β-D-glukoza
PMF	Potential of mean force; Potencial povprečne sile
PSA	Polar surface area; Polarna površina molekule
SDR	Short-chain dehydrogenases/reductases; družina kratkoverižnih dehidrogenaz/reduktaz
Ser	serin
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry System; poenostavljen vrstični molekulski zapisni sistem
TATFAR	TransAtlantic TaskForce on Anitimicrobial Resistance
Thr	Treonin
Tyr	Tirozin
v <sub>0</sub>	Hitrost razpada substrata med encimsko reakcijo
VRSA	Na vankomicin odpornim <i>Staphylococcus aureus</i>
VS	Virtual screening; virtualno rešetanje
XDR-TB	Extremely drug resistant <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; Razširjeno rezistentni sevi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
ε <sub>340</sub>	Ekstinkcijski factor pri 340 nm
μg	Mikrogram
μM	Mikromolarnost (μmol/L)

---

## 1 UVOD

Zdravljenje bakterijskih infekcij s kemoterapeutiki, ki se je začelo v tridesetih letih prejšnjega stoletja, je bilo eno največjih uspehov dvajsetega stoletja. Izvor skoraj vseh dandanes uporabljenih protibakterijskih učinkovin prihaja iz empiričnih testiranj njihovega vpliva na zaviranje bakterijske rasti in sega v tako imenovano zlato dobo razvoja protibakterijskih učinkovin med leti 1940 in 1970. Učinkovine, ki so bile odkrite v tem obdobju in derivati teh učinkovin, ki so jih sintetizirali v kasnejših letih, so poskrbeli za impresiven globalni upad bakterijskih okužb (1,2). V tem obdobju so bile razvite praktično vse skupine protibakterijskih učinkovin, od sedemdesetih let naprej pa do danes pa samo štiri nove in sicer oksazolidinoni (linezolid) leta 2000, ciklični lipopeptidi (daptomicin) leta 2003, plevromutulin (retapamulin) leta 2007 in makrolid fidaksomicin leta 2011 (slika 1) (2,3).



Slika 1: Dinamika odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin.

Glavni razlog za okrnjen razvoj novih protibakterijskih učinkovin je v glavni meri dokaj neugodna donosnost naložb v razvoj tovrstnih učinkovin. Glavni indikator prioritete razvoja novih zdravil je NPV (net present value, neto sedanja vrednost), ki upošteva dolgoročne stroške razvoja in lansiranja izdelka kot tudi začetno investicijo. Izražen je v milijonih dolarjev in naj bi bil leta 2003 za protibakterijske učinkovine 100, za onkološka zdravila 300, nevrološka zdravila 720 in mišično-skeletna 1150. Glede na številke je takoj jasno, da protibakterijske učinkovine niso v prvem planu podjetij, saj se ta odločijo najprej za projekte z najvišjimi NPV (2,4). Na NPV vpliva tudi pojav rezistence, ki lahko signifikantno zmanjša čas pojavljanja zdravila na trgu in s tem povezanega zmanjšanja NPV.

Druga težava pri razvoju protibakterijskih učinkovin je dinamika vstopa tovrstnih spojin na trg zdravil, saj gredo nove protibakterijske učinkovine v rezervo in se redko predpisujejo. To seveda zmanjša možnost pojava rezistence, ni pa dobro za farmacevtsko družbo, saj tako težje povrne vložek za razvoj. To negativno vpliva na razvoj novih učinkovin, saj se farmacevtske družbe zavedajo, da bodo njihove nove protibakterijske učinkovine uporabljenne le v skrajnih primerih. Za primarno zdravljenje okužb bodo najprej predpisane množično uporabljane protibakterijske učinkovine, pa čeprav je dokazana visoka stopnja rezistence (5).

Regulativa na področju razvoja protibakterijskih spojin je na nekaterih področjih zelo omejujoča. Težko je pridobiti zadostno število preiskovancev za klinične študije zaradi slabih presejalnih in identifikacijskih testov bolnikov. Neinferiornost novih učinkovin je še eno od kontradiktornih področij, ki poleg težavnega dokazovanja varnosti in učinkovitosti oddaljuje raziskovalce in farmacevtsko industrijo od odkrivanja novih protibakterijskih učinkovin (5).

Kljub temu, da danes smatramo dostop do učinkovitih protibakterijskih učinkovin kot nekaj samoumevnega, pa številni faktorji to ogrožajo. Demografski trendi gredo v smeri staranja prebivalstva in s tem v povečevanje rizične populacije. Poleg tega se z razvojem medicine opravlja vedno več kompleksnih operacij, presaditev organov, kemoterapij, kar povečuje število imunokomprimiranih bolnikov. Ta socialno-medicinski razvoj potrebuje ogromno količino protibakterijskih učinkovin, kar pa vpliva na širjenje bakterijske rezistence (1).

Najbolj ogrožajoči za javno zdravje so trije razredi odpornih patogenov. Prvi je na meticilin-odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA), ki naj bi bil v ZDA odgovoren za 19.000 smrti na leto. Poleg tega zdravljenje bolnikov z MRSA stane okoli 3-4 milijarde dolarjev na leto, povečana pogostost okužb z MRSA-o pa lahko posledično poveča tudi število okužb z na vankomicin odpornim *Staphylococcus aureus* (VRSA). Drugi razred so gram negativne bakterije (G-), ki so odporne na več skupin zdravil (multi drug-resistant MDR in pandrug-resistant PDR). Sicer so manj pogoste kot MRSA, vendar pa predstavljajo ogromno tveganje, ker jih je praktično nemogoče zdraviti. Sevi *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* in *Pseudomonas aeruginosa* so odporni na nekatere (MDR) ali celo vse (PDR) razrede protibakterijskih učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje G- okužb. Tretjo skupino pa predstavlja MDR in razširjeno-rezistentne (XDR) seve *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB in XDR-TB), ki so vedno večji problem v razvitem svetu.

Zdravljenje MDR-TB traja 2 leti s protibakterijskimi učinkovinami, ki imajo resne stranske učinke, pri XDR-TB pa je to še bolj težavno in se pogosto konča s smrtjo (6). Pojavlja se vprašanje, kako zagotoviti razvoj novih protibakterijskih učinkovin in zaščititi njihovo smiselno uporabo, glede na obstoječi zdravstveni sistem. Na državnji in svetovni ravni je potekalo in še vedno poteka kar nekaj projektov, ki imajo za cilj razvoj protibakterijskih učinkovin, npr. v Evropi EU-INTAFAR (7), globalno pa TATFAR. Ker se velika farmacevtska podjetja umikajo iz razvoja novih protibakterijskih učinkovin, obstaja priložnost za manjša podjetja in neprofitne organizacije, na primer univerze, da signifikantno prispevajo na tem področju (1,8).

### **1.1. Biosinteza bakterijskih maščobnih kislin**

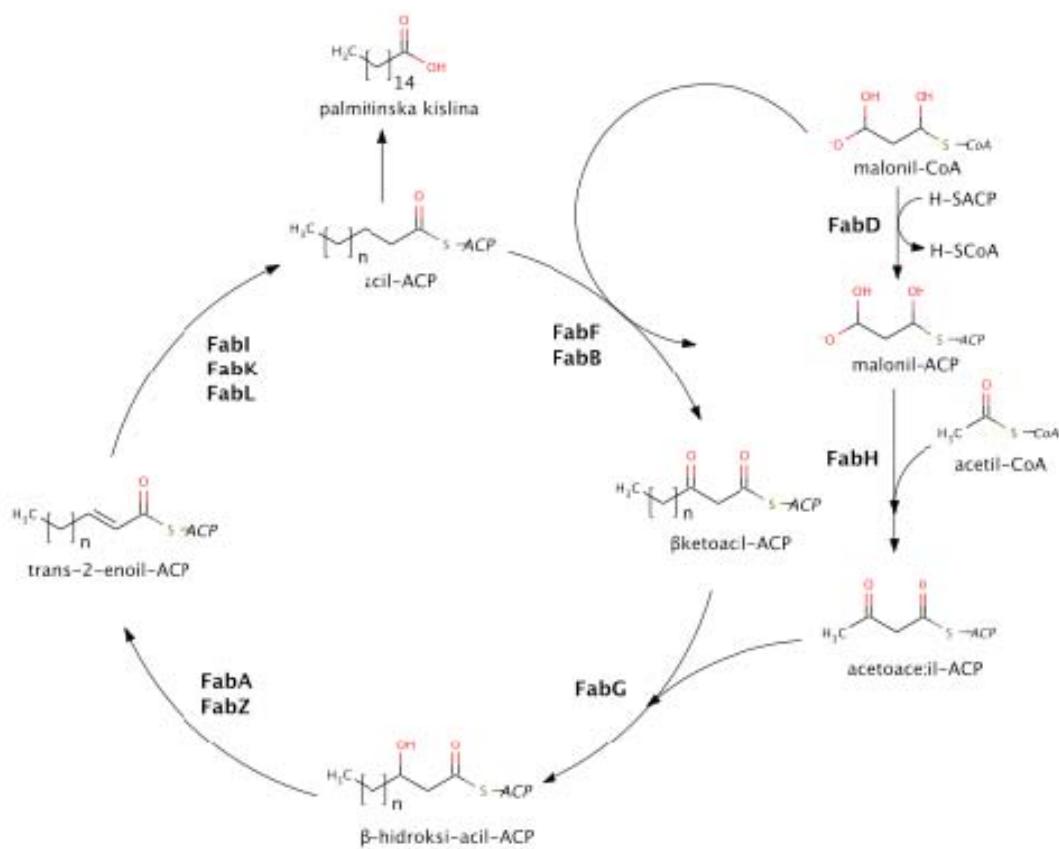
Za preživetje bakterij je pomembna homeostaza lipidne membrane in zmožnost prilagoditve lipidnega sestava na različne zunanje pogoje. Kljub temu, da obstaja v bakterijskem svetu znatna raznolikost fosfolipidnih struktur, membrane večinoma sestavljajo glicerolipidi z dvema maščobnima verigama. Te verige določajo viskoznost membrane, ki močno vpliva na ključne membranske funkcije, kot so permeabilnost za hidrofobne molekule, aktivni transport in interakcije med proteini. Bistven pomen maščobnih kislin v membranski strukturi bakterij je usmeril pozornost na razvoj novih protibakterijskih učinkovin, ki delujejo na njihovo sintezo (9).

Biosinteza maščobnih kislin je esencialni proces vseh živih bitij, ki pa je energijsko zelo potraten. Organizmi so zato razvili homeostatske mehanizme, ki skrbijo za natančno uravnavanje koncentracije lipidov. Pri insektih in sesalcih večino aktivnosti pri sintezi maščobnih kislin izvrši homodimerni multifunkcionalni polipeptid (FAS I), ki ga kodira en sam gen, bakterijska sinteza maščobnih kislin (FAS II) pa sestoji iz več individualnih encimov, ki so kodirani z različnimi geni.

Bakterija proizvaja maščobne kisline z zaporednimi reakcijami, med katerimi so kondenzacija, redukcija, dehidracija in redukcija vezi ogljik-ogljik. Glavna značilnost sistema je, da so vsi acilni intermediati kovalentno vezani na majhen kisel protein ACP (acyl carrier protein). Ta jih prenaša od enega encima do drugega, dokler acil-ACP ne doseže zadostne dolžine in ga aciltransferaze prenesejo v fospholipidno membrano. Ključna molekula v ciklu podaljševanja verig maščobnih kislin je malonil-CoA, ki se tvori s karboksilacijo acetil-CoA z encimom acetil-CoA karboksilazo. Predstavljena biosintezna shema je ohranjena v vseh bakterijah, ki

proizvajajo maščobne kisline. Zaradi substratne specifičnosti encimov v različnih vrstah bakterij najdemo v naravi veliko število različnih maščobnih kislin (10,11).

Glavne reakcije v FAS II se dogajajo v ciklu podaljševanja verige, ki ponavljajoče podaljujejo acilno verigo za dva ogljikova atoma. Podaljševani substrat se pripne v obliki tioestra na terminalno sulfhidrilno skupino 4'-fosfopanteinskega ostanka na ACP, ta pa podaljšujočo verigo vodi skozi kaskado štirih encimov. Najprej  $\beta$ -ketoacil-ACP sintetaza I (FabB ali FabF) podaljša acil-ACP  $C_n$  acilno verigo do  $C_{n+2}$   $\beta$ -ketoacilne oblike. Pod vplivom NADPH odvisne  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaze (FabG, preučevani encim v diplomski nalogi), se  $\beta$ -keto oblika reducira do  $\beta$ -hidroksi intermediata, ki ga nato  $\beta$ -hidroksi acil-ACP dehidrataza (FabA ali FabZ) dehidrira do enoil-ACP. Na koncu se enoilna veriga, pod vplivom enoil-ACL reduktaze (Fab I, Fab K ali Fab L), reducira do acil-ACP oblike s podaljšano  $C_{n+2}$  acilno verigo, ki lahko ponovno vstopi v cikel (11). Potek reakcij prikazuje slika 2.

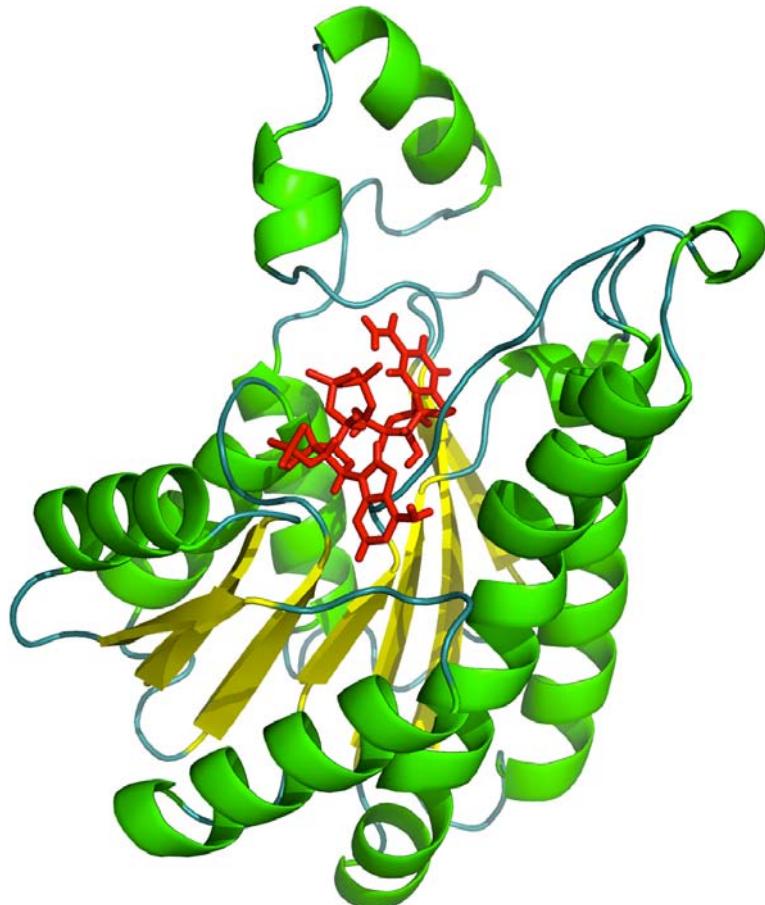


Slika 2: Potek reakcij v ciklu sinteze maščobnih kislin pri bakterijah

## 1.2. $\beta$ -ketoacil reduktaza (FabG) iz bakterije *E. Coli*

FabG je predstavnik naddružine kratkoverižnih dehidrogenaz / reduktaz (SDR), za katere je značilno, da so nemetaloencimi velikosti med 25-35 kDa in delujejo kot dimeri ali tetramerji (12). Encimi iz te skupine imajo vlogo dodajanja oziroma odvzemanja vodikovih atomov s specifičnih substratov v redoks sistemu NAD(H) ali NADP(H). Zaporedje aminokislin se med predstavniki družine SDR močno razlikuje, saj so si podobni le v 15- 30%, po drugi strani pa je njihova struktura zelo podobna. Zanje je značilno posebno izmenjavanje  $\alpha$ -vijačnic in  $\beta$ -ravnin, ki predstavlja strukturni motiv imenovan Rossmannovo zvitje. Utor, ki se s tem ustvari, služi kot nukleotid-vezavno mesto za kofaktor (12,13).

FabG potrebuje za svoje delovanje NADPH, ima monomerno molekulsko maso 25.5 kDa in v raztopini obstaja kot homotetramer. Je visoko ohranjen encim in široko izražen v vseh bakterijah. Je edini znani encim, ki katalizira bistveno redukcijo keto skupine v ciklu podaljševanja v FAS II. Zaradi teh značilnosti se izkazuje kot idealna tarča za razvoj novih zdravilnih protibakterijskih učinkovin (11,14).



Slika 3: Encim FabG z vezanim kofaktorjem NADPH (rdeče).

Aktivno mesto v FabG sestavlja trije aminokislinski ostanki, Tyr 151, Lys 155 in Ser 138. Tyr 151 in Lys 155 skrbita za prenos protona na keto skupino substrata, Ser 138 pa v aktivnem mestu tvori vodikovo vez (H-vez) s keto skupino tioestera in s tem pravilno orientira  $\beta$ -ketoacil-ACP. V procesu katalitične redukcije v aktivnem mestu FabG se prenese hidridni ion iz nikotinamidnega obroča NADPH na C3 ogljik  $\beta$ -ketoacil-ACP, Tyr 151 pa donira proton C3 kisikovemu atomu. Proton se mora za naslednjo reakcijo obnoviti, za kar naj bi skrbel Lys 155. To naj bi storil prek idealno postavljenih molekul vode in preko 2'-hidroksi skupine na ribozi NADPH. Pomembno vlogo igra tudi Asn 110, ki služi kot glavni strukturni element v protonski kaskadi (11,13).

Ugotovljeno je bilo, da je FabG pred katalizo podvržen znatnim strukturnim spremembam. Med vezavo kofaktorja v encim se aktivno mesto močno spremeni. Te spremembe so pomembne, saj se pri tem formira katalitično kompetentna konformacija aktivnega mesta, odstrani se sterični balast, ki bi lahko interagiral s kofaktorjem, vzpostavi se protonska kaskada, ki je nujna za katalitično aktivnost, spremeni pa se tudi kvarterna struktura tetramernega encima (11). Aktivno mesto, ki ga tvorijo trije aminokislinski ostanki, Ser 138, Tyr 151 in Lys 155, se pri tem znatno spremeni. Pri vseh se spremeni položaj  $\alpha$  ogljikovega atoma in konfiguracija stranske verige. Hidroksilna skupina na Ser 138 se zasuče za  $180^\circ$  in se usmeri proti aktivnemu mestu. Hidroksilna skupina na Tyr151 se zasuče za  $120^\circ$ , s tem pa omogoči tvorbo vodikove vezi z 2'-hidroksi skupino na ribozi NADPH. Stranska veriga Lys 155 se zavrti za  $90^\circ$ , s tem pa omogoči terminalni amino skupini, da interagira prek vodikove vezi z 2' in 3' hidroksi skupino na ribozi. Poleg aktivnega mesta se znatno spremeni položaj tudi aminokislinskim ostankom 87-91, ki ležijo znotraj vezavnega mesta za NADP<sup>+</sup> (13).

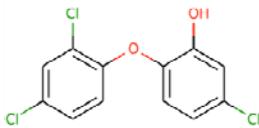
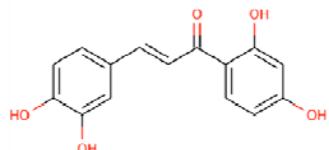
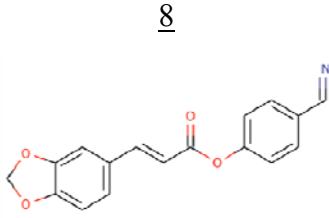
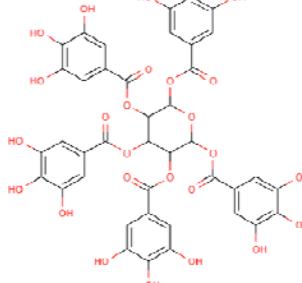
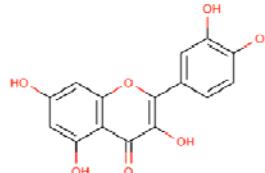
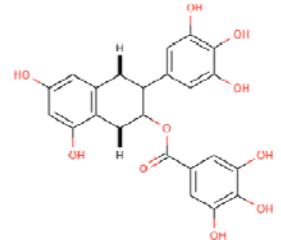
FabG je alosterično reguliran encim, kjer vezava NADPH poveča afiniteto za vezavo acil-ACP v aktivno mesto encima. Arg 129 in Arg 172 naj bi bila ključna za interakcije ACP-FabG in naj bi bila tudi ključna za formacijo aktivnega mesta na encimu. Vezava NADPH kaže negativno kooperativnost, saj vezava v aktivno mesto encima oteži vezavo NADPH na ostala mesta (11).

### 1.2.1. Znani inhibitorji na (FabG)

Kar nekaj naravnih substanc je bilo do zdaj preizkušenih na zaviranje encima FabG. V študije so bili vključeni ekstrakti iz zelenega čaja in javorjevih listov. Kemijsko so to polifenoli, ki spadajo v skupino flavonoidov. Med njimi so bili najbolj zanimivi katehini in derivati galne kisline (15). Tovrstne spojine naj bi delovale prek zaviranja vezave kofaktorja v aktivno mesto encima. 1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glukoza (PGG) deluje samo na kompleks encim-kofaktor, epigalokatehin galat (EGCG) pa tudi na apoencim (16). Polifenoli so znani po tem, da se nespecifično vežejo na veliko število tarč, zato so možnosti za razvoj protibakterijskih učinkovin iz njih dokaj omejene (12).

Poleg naravnih je bilo preizkušenih tudi kar nekaj sinteznih učinkovin, med njimi triklosan in derivati cimetne kisline, ki so izkazovali aktivnost v dokaj visokih mikromolarnih koncentracijah (12). Strukture znanih zaviralcev FabG so zbrane v preglednici I.

**Preglednica I:** Znani inhibitorji FabG.

Triklosan	Butein	Spojina 8
		
1,2,3,4,6-penta-O-galoil- $\beta$ -D-glukoza (PGG)	Kvercetin	Epigalokatechingalat (EGCG)
		

### **1.3. Iskanje novih zdravilnih učinkovin z računalniškimi metodami**

V preteklosti je bila glavna tehnika iskanja novih zdravilnih učinkovin empirično preizkušanje učinkovitosti posameznih spojin iz knjižnic spojin na bioloških tarčah. V poznih osemdesetih in devetdesetih letih so se intenzivno razvijale metode visoko zmogljivega rešetanja (high-throughput screening – HTS) in kombinatorne kemije s ciljem odpraviti ozko grlo v načrtovanju spojin. S tem naj bi zagotovili ogromno število novih spojin vodnic in znatno število novih zdravil na trgu. Začetna evforija pa se je kmalu polegla, saj metoda prinaša zelo nizko stopnjo zadetkov, težko validacijo in nadaljnjo optimizacijo ter visoke stroške (17,18). Po ocenah naj bi kar 14% stroškov razvoja zdravilnih učinkovin padlo na HTS testiranja (19).

V želji po zniževanju stroškov in zmanjševanju razvojnega časa, se je razmišljanje spremenilo iz naključnega iskanja spojin v racionalno načrtovanje kemijskih spojin in s tem v izboljšanje farmacevtskih raziskav, razvoja in produktivnosti. Danes temelji razvoj novih učinkovin na identificiraju potencialnih zadetkov iz ogromnih fizičnih in virtualnih knjižnic spojin. Kar nekaj korakov v tem procesu, na primer identifikacijo zadetkov, optimizacijo spojin vodnic in farmakokinetični model, lahko optimiziramo z uporabo računalniških metod (20).

Virtualno rešetanje (virtual screening - VS) je računalniška metoda za identifikacijo spojin zadetkov iz obsežnih knjižnic kemijskih učinkovin. S pomočjo algoritmov poskušamo oceniti vezavo molekul v določeno tarčno mesto. Razvoj proučevanja in določevanja 3D strukture proteinov in napredek na področju visoko zmogljive rentgenske kristalografije je prinesel mnogo novih potencialnih terapevtskih tarč (v letu 2011 je bilo razrešenih že preko 78000 struktur tarč), s tem pa se je odprlo ogromno področje za uporabo računalniških metod (21–23). Razvoj računalniške opreme, vedno večja procesorska moč in hitrost ocenjevalnih algoritmov so močno vplivali na dinamiko odkrivanja zdravilnih učinkovin, zato je postalo virtualno rešetanje nepogrešljiv način odkrivanja spojin ozioroma predstavlja dodano vrednost klasičnim metodam (20,22).

Zelo pomembna pri VS je ustrezna priprava knjižnice spojin, saj je rešetanje ogromnih knjižnic spojin časovno potratno, kasnejša izbira ustreznih zadetkov pa še dodatno breme. Zato je veliko bolj smiselno že na začetku odstraniti vse neželene spojine in v virtualno sidranje vključiti samo relevantne spojine. Pri tem govorimo o

obogativiti knjižnice, saj se verjetnost zadetka znotraj tako skrčene knjižnice poveča (17,19).

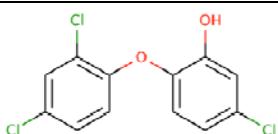
Vedno večji pomen računalniških metod se vidi tudi v količini objavljenih člankov na to temo. Kratek preizkus nam pokaže, da je bilo na temo »Virtual screening« leta 2001 objavljenih manj kot 20 člankov, leta 2012 pa že več kot 400 (24,25).

Metode virtualnega načrtovanja spojin so na tržišče lansirale že kar nekaj zdravilnih učinkovin, med drugimi inhibitorje HIV-proteaze (nefinavir, sekvinavir, amprenavir in druge), inhibitorje nevraminidaze (zanamivir, oseltamivir), zaviralce trombina (ksimelagatran, dabigatran) in zdravila za zdravljenje različnih oblik raka (imatinib, erlotinib) (26).

### 1.3.1. Različni formati spojin

Pri računalniškem načrtovanju spojin potrebujemo zapis spojin v ustreznih oblikah, da lahko izvajamo želene operacije. V ta namen se največkrat uporablja format SMILES, ki nam poljubno 2D obliko molekule pretvori v tekstovno obliko s končnico \*.smi (27). Če želimo pretvoriti format SMILES v 3D obliko, lahko uporabimo program OMEGA2, ki nam producira različne konformacije molekul s končnicami \*.sdf, \*.mol2 in \*.oeb (28). Za pretvarjanje različnih oblik med seboj pa je uporaben program BABEL (29).

**Preglednica II:** Različni kemijski zapisi za molekulo triklosana

IUPAC poimenovanje:	5-kloro-2-(2,4-diklorofenoksi)fenol
Strukturna formula	
SMILES koda:	Oc1cc(Cl)ccc1Oc2ccc(Cl)cc2Cl

### 1.3.2. Filtriranje in priprava knjižnice

Za uspešno virtualno rešetanje potrebujemo dobro knjižnico spojin. Obstaja kar nekaj javno dostopnih knjižnic spojin, med drugim NCI (National Cancer Institute),

PubChem, ZINC, ChEMBL in drugi. V akademskem okolju se največ uporabljata prav NCI v kateri je okoli 280.000 spojin in ZINC, ki vsebuje več kot 21.000.000 spojin (30,31). V preteklosti je pod vplivom kombinatorne kemije in HTS prišlo do eksplozije novih spojin, ki pa so se v veliko primerih izkazale za neprimerne. Običajno so bile to spojine z neustrezno topnostjo in molekulsko maso. Z ustreznim filtriranjem bi lahko izločili spojine z neugodnimi lastnosti in obdržali le tiste z ustreznimi karakteristikami. Velik napredok na področju racionalnega načrtovanja knjižnic spojin je naredil Christopher A. Lipinski s svojim konceptom "drug-like". Analiziral je fizikalne lastnosti zdravilnih učinkovin na tržišču in razvil pravilo petic. Spojine, ki jih klasificiramo kot "drug-like", naj bi imele naslednje lastnosti: molekulsko maso  $< 500$ , LogP  $< 5$ , število donorjev H-vezi  $< 5$  in število akceptorjev H-vezi  $< 10$ . Spojine, katerih vrednosti so izven mej pravila petic, imajo običajno slabe ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija) lastnosti in so manj primerne kot zdravilne učinkovine (32).

Pravilo petic pa ne velja za vse skupine zdravilnih učinkovin. Nekoliko spremenjena pravila veljajo za zdravilne učinkovine, ki se uporabljajo za zdravljenje infekcijskih bolezni. Te spojine morajo preiti bakterijsko celično steno, pri G- bakterijah pa še zunanjo membrano, ki je praktično neprehodna za večino majhnih molekul. Protibakterijske učinkovine se od ostalih zdravilnih spojin razlikujejo predvsem po večji molekulski masi, večji polarni površini (polar surface area - PSA) in večji hidrofilnosti (33).

Pravilo petic je dvignilo zavedanje o pomembnosti fizikalno-kemijskih lastnosti zdravilnih učinkovin, vendar pa se je izkazalo, da tudi "drug-like" knjižnice niso optimalne. Problem nastane pri optimizaciji molekul, ki skoraj vedno vključuje povečanje molske mase in logP, kar pa lahko spojino postavi izven želenih vrednosti. Na podlagi primerjave med zdravilnimi učinkovinami in spojinami, iz katerih so bile razvite, je Tudor I. Oprea ugotovil, da imajo slednje manjšo molsko maso, nižji logP, manj akceptorjev H-vezi in manj vrtljivih vezi. Pri načrtovanju "lead-like" knjižnic moramo upoštevati naslednja pravila: molekulska masa  $< 450$ ,  $-3.5 < \text{LogP} < 4.5$ , število aromatskih obročev  $< 4$ , število donorjev H-vezi  $< 5$ , število akceptorjev H-vezi  $< 8$  in število nekončnih enojnih vezi  $< 10$  (34).

Pri *in vitro* testiranju spojin so velik problem promiskuitetne spojine, ki dajejo lažne pozitivne rezultate. Prek samozdruževanja tvorijo v vodnih raztopinah aggregate, ki

nespecifično delujejo na različne tarče. To lahko preprečimo z dodatkom detergenta v testni sistem ali pa z ustreznim filtriranjem testne knjižnice spojin (35).

Za filtriranje lahko uporabimo različne programe, ki se razlikujejo glede na kompleksnost izbirnega postopka (19). Eden od programov, ki je zmožen filtriranja velike knjižnice spojin in ga odlikuje velika hitrost procesiranja je program FILTER, ki smo ga uporabili pri našem delu. Program uporablja osnovne deskriptorje, kot so MM, PSA, logP, akceptorji in donorja H-vezi in število aromatskih obročev. Zmožen je prefiltrirati do 400 molekul na sekundo, pri čemer lahko uporabimo filtre Lipinski, Egan, Martin ali Weber ADME (36).

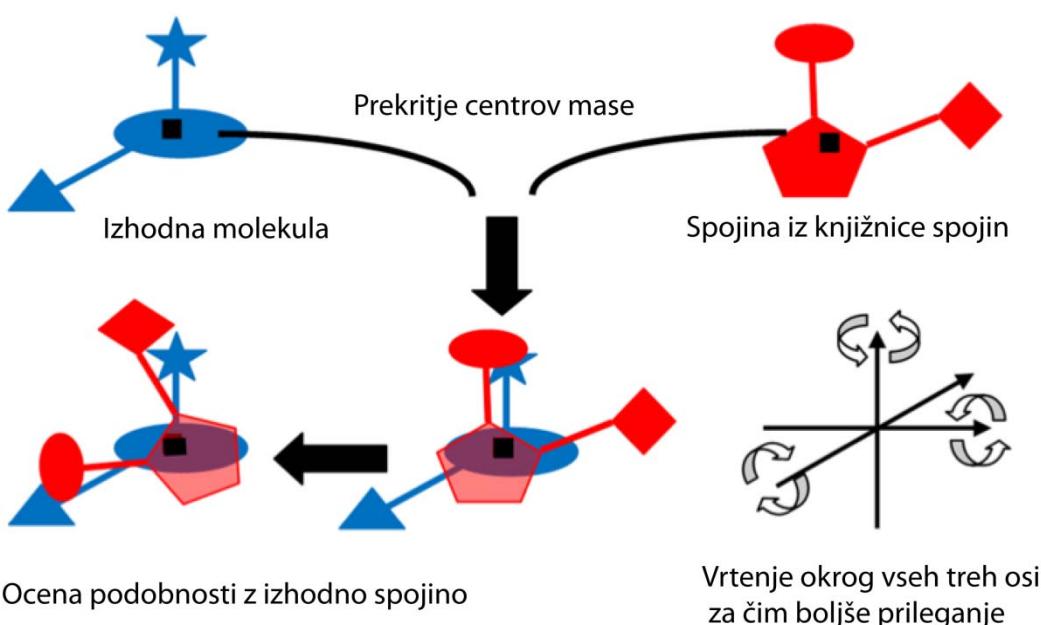
### 1.3.3. Virtualno rešetanje na osnovi liganda

Tehnike virtualnega rešetanja na osnovi liganda temeljijo na analizi molekulske podobnosti med spojinami z znano ali neznano aktivnostjo. Glavna prednost tega pristopa je, da ne potrebujemo strukture tarčnega proteina temveč strukturo spojine, ki se veže v aktivno mesto. Nekateri viri navajajo tudi, da je bolje poznati strukturo aktivnega liganda kot pa strukturo tarčnega proteina (20,37). Metode virtualnega rešetanja na osnovi liganda lahko razdelimo v štiri glavne razrede, ki uporabljajo različne algoritme:

- **Rešetanje na osnovi binarnih prstnih odtisov** je njenostavnejša metoda za primerjavo med spojinami. Program primerja določene lastnosti pri obeh molekulah (funkcionalne skupine ) in poda vrednost 1 (enako) ali 0 (ni enako). Na podlagi teh vrednosti program sestavi tako imenovane prstne odtise molekule in iz njih izračuna indeks podobnosti. Molekule, ki imajo podobno strukturo, bodo zelo verjetno delovale na podoben način. Obstaja več vrst indeksov, eden najbolj uporabljenih je indeks Tanimoto (20,38). Problem tovrstnega pristopa je, da pridobimo strukturno zelo podobne spojine. V kolikor želimo pridobiti strukturno različne spojine, je potrebno uporabiti več deskriptorjev (39).
- **Rešetanje na osnovi farmakofora** primerja spojine na podlagi 3D razporeditve farmakoforjev. Na ta način lahko pridobimo strukturno zelo različne spojine, ki pa imajo podobno prostorsko razporeditev glavnih funkcionalnih skupin (40,41).

- **Rešetanje na osnovi računalniško podprtega učenja** temelji na razvoju programa, ki na podlagi karakteristik zbirk aktivnih in neaktivnih spojin predvideva strukturne zahteve (42).
- **Rešetanje na osnovi oblike in volumna** ocenjuje podobnost med spojinami na podlagi superpozicije in podobnosti volumna. Programi upoštevajo samo volumen in ignorirajo kemijsko strukturo, zato lahko pridobimo strukturno povsem nove spojine.

Eden najboljših programov, ki rešetajo knjižnice spojin na podlagi oblike in volumna je ROCS, ki smo ga uporabili tudi pri našem delu. Deluje tako, da prekrije center mase obeh spojin, nato pa jih vrти po vseh treh oseh, da dobi najboljše ujemanje (slika 4). Odlikuje ga izredno hitra obdelava spojin, primerja lahko kar 600 – 800 konformerov na sekundo. Program uporablja dva principa in sicer Shape Tanimoto in Colour Tanimoto. Shape Tanimoto s pomočjo normalne porazdelitve primerja volumne obeh preiskovanih molekul in poda vrednost med 0 in 1, kjer 1 pomeni popolno ujemanje. Colour Tanimoto primerja položaj deskriptorjev kot so akceptorji in donorji H-vezi, aromatski obroči, kationske in anionske skupine ter hidrofobna področja in poda vrednost med 0 in 1, kjer 1 pomeni popolno prileganje. Obe metodi lahko seštejemo in dobimo Tanimoto Combo, ki ima vrednosti med 0 in 2, kjer 2 pomeni popolno ujemanje (43).



Slika 4: Delovanje programa ROCS.

#### 1.3.4. Virtualno rešetanje na osnovi tarče

Za virtualno rešetanje na osnovi tarče potrebujemo 3D strukturo tarčne molekule, ki jo pridobimo z rentgensko kristalografijo, NMR ali homolognim modeliranjem. V to strukturo sidramo pripravljeno knjižnico spojin in s pomočjo programa napovemo način vezave in konformacijo spojin, s cenilno funkcijo pa razvrstimo jakost vezave spojin od najboljše do najslabše. Preden pa začnemo z rešetanjem, moramo upoštevati pomembne aspekte proteina, kot so primernost receptorja za razvoj zaviralcev, izbira najustreznejše geometrije proteina, fleksibilnost receptorja, ustrezna stopnja protoniranosti in upoštevanje vodnih molekul v aktivnem mestu. Strukturno podprt rešetanje lahko razdelimo na dva dela: na strukturno modeliranje oziroma sidranje (ang. docking) in na napoved aktivnosti s pomočjo cenilnih funkcij (ang. scoring) (20).

Velik problem sidranja je fleksibilnost tarčne molekule, saj preko rentgenske kristalografije dobimo samo konformacijo proteina v nekem trenutku. Znano pa je, da se lahko protein pri vezavi liganda znatno konformacijsko spremeni. Tej težavi se sicer lahko zoperstavimo s kokristalizacijo zaviralca v aktivno mesto, kar pa problema ne reši popolnoma (17,31).

Idealni program za sidranje bi moral upoštevati tako fleksibilnost proteina kot tudi liganda, poleg tega pa še vpliv vodnih molekul v aktivnem mestu (44). Vendar pa je posledica tega kombinatorna eksplozija različnih konformacijskih možnosti, zato programi uporabljajo določene algoritme za določitev konformacije in vezave ligandov v aktivno mesto. Programi se glede na to, kako umeščajo ligande v aktivno mesto proteina, delijo na simulacijske, sistematične in naključne oz. stohastične (20)

- **Simulacijske metode**, med katerimi sta molekulska dinamika in energijska minimizacija, so zelo natančne metode, ki upoštevajo fleksibilnost receptorja in liganda. Molekulska dinamika uporablja aproksimacije na podlagi newtonskih sistemov za opis premikov atomov. Najprej potrebujemo računalniški model molekulskega sistema, ki ga pridobimo z NMR, kristalografijo ali homolognim načrtovanjem. S pomočjo matematičnih enačb ocenimo sile, ki delujejo na vsak atom v sistemu. Program nato v skladu s fizikalnimi zakoni spremeni pozicijo atomov in ponovi postopek, dokler

sistem ni minimaliziran. Programi, ki se uporabljo za molekulsko dinamiko, so AMBER, CHARMM in NAMD (45,46).

- **Naključne oz. stohastične metode** umestijo ligand v aktivno mesto in mu naključno spremenijo torzjske kote, program pa nato izbere najbolj ustrezen konformacije. Najbolj znana algoritma sta Monte Carlo, ki ga uporablja program AutoDock, in genetski algoritmi, ki jih uporablja programa DOCK in GOLD. Algoritem Monte Carlo generira pozicije liganda preko vrtenja vezi, translacije in rotacije. Program oceni nastalo konformacijo in v primeru, da zadosti minimalnim pogojem, služi kot predloga za nadaljnje modifikacije. Genetski algoritem uporablja Darwinovo razvojno teorijo. Informacije o poziciji liganda so shranjene kot binarni nizi, imenovani geni, ki skupaj tvorijo kromosom. Preko mutacij in zamenjav se tvorijo nove konformacije liganda, pri čemer pride pri mutacijah do naključnih sprememb, pri zamenjavah pa do izmenjav genov med kromosomi. Cenilna funkcija oceni vezavo in hrani samo najbolje ocenjene zadetke, ki se uporabijo kot naslednja generacija (47).
- **Sistematiche metode** poskušajo preiskati vse prostostne stopnje molekule, vendar pa se morajo soočiti s kombinatorno eksplozijo konformerov. Nekateri programi najprej sidrajo centralni rigidni del molekule nato pa zraven dodajajo stranske verige. Pri tem se DOCK 4.0 osredotoča predvsem na sterične omejitve, FlexX pa na pozicijo funkcionalnih skupin. Druga možnost je ločena vezava fragmentov molekule in nato izgradnja najugodnejše konformacije. Tak princip uporablja program eHits. Programi pa lahko uporabljo tudi vnaprej pripravljene knjižnice s konformeri spojin in sidrajo vsak konformer rigidno. Tak pristop uporablja program FRED (46).

Ocena jakosti vezave in rangiranje vezanih konformacij ligandov sta ključna aspekta strukturno podprtga rešetanja. V ta namen so bile razvite cenilne funkcije, ki jih razdelimo na cenilne funkcije na osnovi polja sil (forcefield based), empirične cenilne funkcije (empirical) in cenilne funkcije, dobljene s pomočjo statistične mehanike (knowledge based)

- **Cenilne funkcije na osnovi polja sil** upoštevajo energijo ligand-receptor in notranjo energijo liganda. Običajno je pri teh funkcijah predpostavljena

rigidna struktura proteina, kar močno olajša računanje. Interakcije med ligandom in receptorjem so večinoma posledica van der Waalsovih sil, ki jih obravnava Lennard-Jonesova funkcija, in elektrostatičnih sil, ki jih obravnava Coulombova funkcija. Glavna problematika teh metod je neupoštevanje solvatacijskega in entropijskega prispevka. Programi, ki uporabljajo tovrstne metode, so Autodock, G-score, D-score.

- **Empirične cenilne funkcije** temeljijo na ideji, da lahko vezavno energijo aproksimiramo s posameznimi nepovezanimi členi. Podatke dobimo s pomočjo regresije iz eksperimentalno določenih vezavnih energij in s pomočjo rentgenske kristalografije. Metoda je uporabna, kadar uporabljam sorodne proteine, težaven pa je prenos na druge družine proteinov. Med te funkcije spadajo F-score, ChemScore in LUDI.
- **Cenilne funkcije, dobljene s pomočjo statistične mehanike (Knowledge based)** ocenjujejo podobnost z eksperimentalnimi strukturami, ki jih pridobimo iz strukture proteina. Prednost metode je, da je računalniško nezahtevna in je zmožna oceniti velike knjižnice podatkov, vendar je pomanjkljivost ta, da so pravila postavljena na omejenem številu kristalnih struktur. Po tem principu delujeta funkciji DrugScore in PMF (Potencial of Mean Force).

Zaradi zavedanja, da imajo cenilne funkcije veliko pomanjkljivosti, je uporaben način tudi konsenz med cenilnimi funkcijami. Ta metoda združi podatke iz različnih cenilnih funkcij in s tem poveča možnost za resnično aktiven ligand. Najboljšo oceno bi tako doobile spojine, ki bi jih več programov uvrstilo visoko. Problem pa je, da si rezultati posameznih cenilnih funkcij dokaj korelirajo, zato z združevanjem lahko napake še povečamo. Tovrstne cenilne funkcije uporablja program eHits (17,20,31,46).

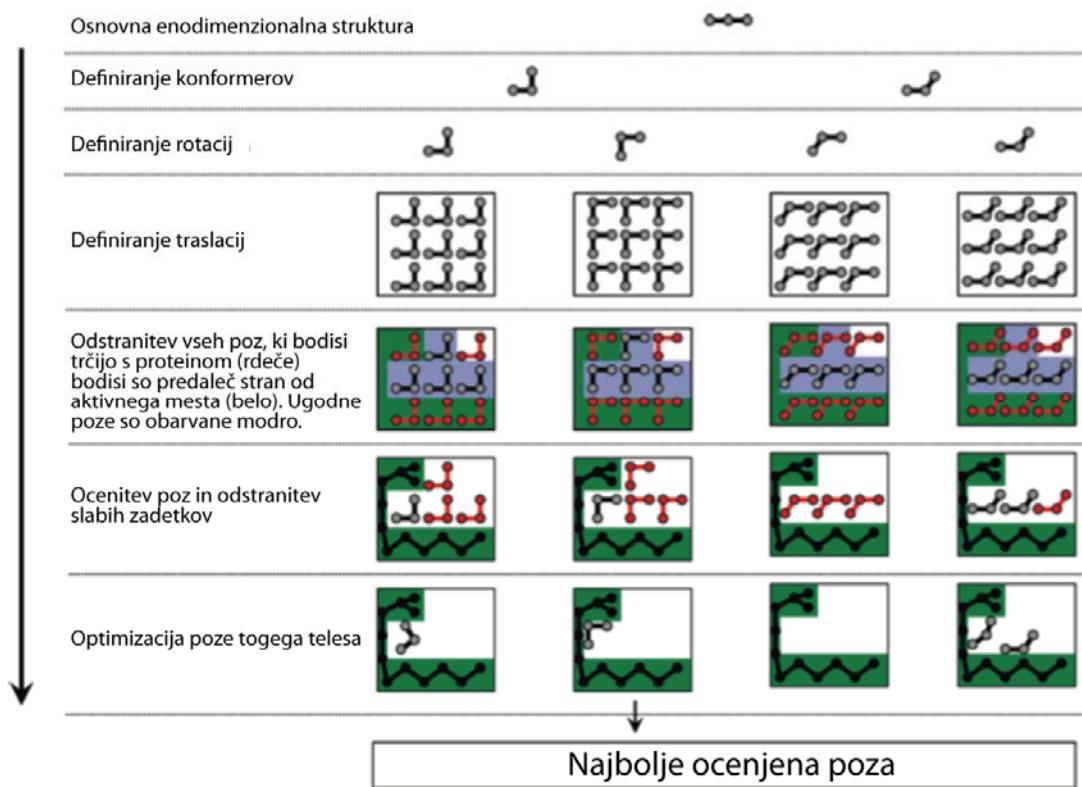
Za svoje delovanje uporablja cenilne funkcije številne poenostavitve, ki pa seveda vplivajo na pravilnost dobljenih podatkov. Gonilo vezave liganda na receptor so spremembe v entropiji in entalpiji, vendar pa cenilne funkcije v glavnem upoštevajo le entalpijske vplive, solvatacijske in entropijske pa običajno zanemarijo.

Za cenilne funkcije je znano, da težko korelirajo molekulsko maso in število prostovrtljivih vezi proti vezavni energiji. Večje molekule lahko hipotetično tvorijo večje

število vezi in jih zato programi uvrščajo višje kot bolj fleksibilne ligande. Poleg tega je veliko boljše predvidevanje vezave v lipofilna kot pa hidrofilna aktivna mesta. Razlog je v tem, da lahko lipofilna mesta zelo dobro aproksimiramo s primerjavo oblike liganda in vezavnega mesta. Od prvih poskusov sidranja obstajajo robustne metode za računanje oblike, vendar pa zelo težko upoštevajo vpliv desolvatacije hidrofobnih ligandov, ki je pogosto glavni del hidrofobih efektov. Velik problem je tudi pri ocenjevanju elektrostatičnih interakcij. V ta namen se uporabljam enostavni Coulombovi modeli, ki pa velikokrat dajejo preveliko težo interakcijam nabojs-nabojs. Cenilne funkcije so tudi nagnjene k boljši oceni promiskuitetnih spojin (frequent hitters), ki nespecifično inhibirajo več encimov. To naj bi bila posledica pretežno lipofilnega karakterja spojin in tendenca po tvorbi agregatov, ki vplivajo na rezultate računalniških simulacij in *in vitro* testiranj. Priporočljivo je, da tovrstne spojine izključimo že v procesu priprave knjižnice. V veliki večini vezavnih mest so pri vezavi liganda udeležene tudi molekule vode. Voda lahko močno vpliva na rezultate in na vrednost cenilne funkcije (46,48,49).

Kljub vsem pomankljivostim in poenostavitvam pa virtualno rešetanje na osnovi tarče prinaša rezultate, saj gre za obogatitev knjižnice spojin. Pravilna določitev vezavnih energij in rangiranje najboljših zadetkov nista nujna za smiseln izbor spojin. Bolj pomembno je, da odstranimo spojine, ki nimajo ustreznih struktur in s tem povečamo verjetnost nahajanja zadetka znotraj skrčene knjižnice spojin. Cilj sidranja je, da so želene spojine znotraj določenega območja (npr. najboljših 100 spojin), ki jih nato testiramo. Tudi vizualni pregled zadetkov, kjer uporabimo kemijsko intuicijo, znanje in izkušnje, poskrbi, da izberemo primerne spojine za testiranje (46,50).

FRED je program za sidranje spojin, ki sistematično sidra vnaprej pripravljene 3D konformacije ligandov v aktivno mesto encima. Preden izvede analizo podobnosti oblike in pozicije farmakoforov, izbere najbolje vezane konformacije liganda in jih optimizira s pomočjo funkcije Chemgauss3 (slika 5) (51).



Slika 5: Algoritem programa FRED pri sidranju v aktivno mesto proteina.

### 1.3.5. Vizualizacija spojin in makromolekul

Večina programov zaradi hitrejšega procesiranja ogromnih knjižnic spojin deluje v tekstovnem načinu. Kljub temu pa je pomembno, da spojine med raziskovanjem pregledamo ozziroma uporabimo programe kot pomoč pri načrtovanju spojin. Za pregled spojin in za izvoz grafik v druge programe smo uporabili program VIDA (52). Prav tako je smiselno opredeliti kvaliteto sidranih molekul in interakcije med ligandom in vezavnim mestom. To nam omogoča program PyMOL, ki je namenjen predvsem vizualnemu pregledovanju proteinov (53).

## 2 NAČRT ZA DELO

Z metodami virtualnega rešetanja in sidranja bomo iskali nove zaviralce encima FabG iz *E. coli*. Uporabili bomo kristalno strukturo encima FabG z vezanim kofaktorjem NADPH (PDB: 1Q7B). S programom filter bomo najprej prefiltrirali knjižnico spojin ZINC, v kateri je več kot 21 milijonov spojin. Dobljeno knjižnico spojin bomo s programom ROCS rešetali na osnovi molekulske oblike in sicer bomo kot osnovo vzeli triklosan, ki je znan zaviralec FabG in FabI. Obdržali bomo 100.000 spojin, ki jih bomo s programom FRED sidrali v aktivno mesto encima. S programom Vida bomo pregledali 100 najboljših zadetkov in izbrali kandidatne spojine za testiranje. Glede na razpoložljivost in finančno dostopnost bomo naročili približno 20 spojin in testirali njihovo inhibitorno aktivnost *in vitro* na encimu FabG. Na podlagi inhibitorne aktivnosti *in vitro* bomo podali strukturne zahteve za zaviralce encima FabG in predstavili možne smernice nadaljnega razvoja.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1. Računalniške metode

**Računalnik, ki smo ga uporabili pri virtualnem rešetjanju in sidranju sestavlja naslednje komponente:**

Procesor: štirikrat osemjedrni AMD Opteron 2.0 GHz,

Pomnilnik in trdi disk: 32 GB RAM, dvakrat 750 GB Operacijski sistem: 64-bit Scientific Linux 6.2.

**Programska oprema, ki smo jo uporabili za načrtovanje spojin:**

Risanje molekul: program MarvinSketch 5.11.3 in Molinspiration Cheminformatics (54)

Pretvorba formatov molekul: program OpenBabel 2.2.3,

Generiranje konformacij molekul: program Omega 2.3.2, OpenEye Inc.

Filtriranje knjižnic spojin: program Filter 2.0.2, OpenEye Inc.

Vizualizacija molekul: programa VIDA 4.0.0, OpenEye Inc. in PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC

Sidranje: program FRED, OpenEye Inc.

Virtualno rešetanje na osnovi 3D-podobnosti: program ROCS 3.0.0, OpenEye Inc.

Molekulska dinamika: NAMD 2.7

### **3.2. Spektrofotometrično določanje inhibitornih lastnosti**

**Aparatura, ki smo jo uporabljali pri meritvah:**

Spektrofotometer: BioTek Synergy H4 Multi-mode microplate reader

**Programska oprema:**

Gen5™ 2.0 Data Analysis Software

## **4 POSTOPEK DELA**

### **4.1. Priprava knjižnice spojin za sidranje**

Spojino triklosan smo s pomočjo spletnega programa Molinspiration skicirali in pretvorili v kemijsko bolj uporabno obliko SMILES (\*.smi). S programom Omega2 smo zgenerirali ustrezni 3D format (\*.sdf), kot parameter pa smo vnesli ukaz *maxconfs 1*. S tem smo ohranili samo eno energetsko ugodno konformacijo.

*Ukaz: Omega2 –in triclosan.smi –out triclosan.sdf –maxconfs 1*

Razlaga ukazov: -in (vhodna datoteka); -out (izhodna datoteka); -maxconfs (število konformacij)

Za našo knjižnico spojin smo izbrali prosto dostopno knjižnico spojin ZINC. Za naše potrebe je bila najboljša izbira ZINC\_druglike (verzija 2010), ki vsebuje 10.800.00 spojin. Spojine v tej knjižnici imajo naslednje značilnosti: molekulska maso med 150 in 500, logP < 5, število vrtljivih vezi < 8, PSA < 150, število akceptorjem H-vezi < 10 in število donorjev H-vezi < 5.(30)

S programom Filter smo najprej dodatno zmanjšali knjižnico spojin ZINC\_druglike. Določili smo izhodno molekulsko maso med 200 in 450, z dodatnimi parametri pa smo odstranili reaktivne skupine. To rešetanje je služilo kot dodatno preverjanje ustreznosti knjižnice spojin ZINC\_druglike.

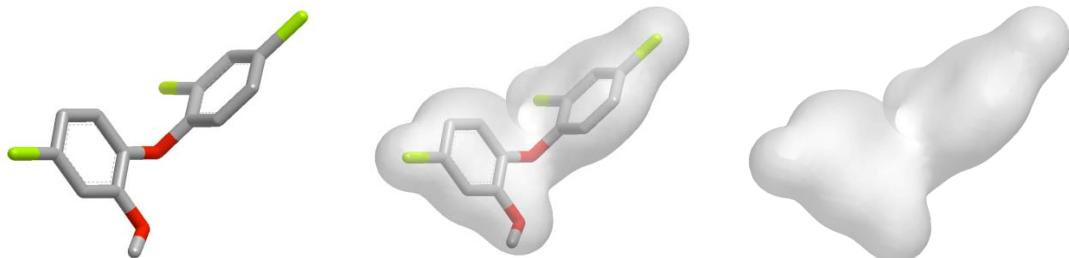
*Ukaz:* filter -in ZINC\_druglike.smi -out ZINC\_druglike\_filtered.smi

S programom Omega2 smo generirali do 250 energetsko najbolj ugodnih konformacij spojin iz knjižnice ZINC\_druglike\_filtered.smi. Dobljeno knjižnico spojin smo uporabili za virtualno rešetanje na osnovi liganda.

*Ukaz:* omega2 -in ZINC\_druglike\_filtered.smi -out ZINC\_druglike\_multiconfs.oeb.gz  
-maxconfs 250

Razlaga ukazov: Maxconfs 250 (največje število konformacij ene spojine)

Program ROCS smo uporabili za rešetanje na osnovi liganda. S predlogo triklosana (slika 6) smo rešetali pripravljeno knjižnico spojin ZINC\_druglike\_multiconfs. Dobljeno knjižnico spojin smo uporabili za sidranje v aktivno mesto encima FabG.



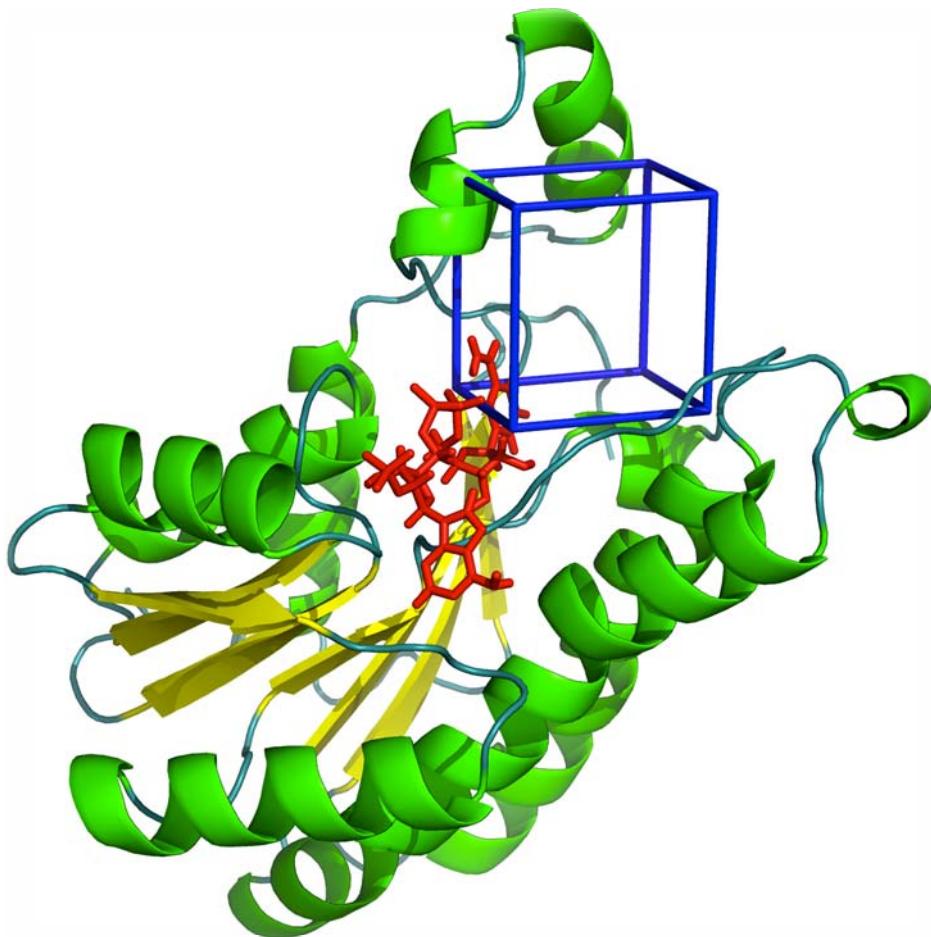
**Slika 6:** Pretvorba triklosana v predlogo za rešetanje na podlagi oblike in volumna s programom ROCS.

*Ukaz:* rocs -query triclosan.sdf -dbase -ZINC\_druglike\_multiconfs.oeb.gz -rankby tanimotoCombo -besthits 100000 -prefix rocs\_hits\_100.oeb.gz

Razlaga ukazov: query (datoteka, ki služi kot predloga za primerjanje), dbase (naša knjižnica spojin za rešetanje), rankby (določimo algoritem, s katerim želimo, da program razvrsti zadetke), besthits x (količina zadetkov, ki jih želimo obdržati), prefix (želeno ime izhodne datoteke)

#### 4.2. Priprava proteina in določitev aktivnega mesta

V banki proteinov smo pridobili protein z oznako PDB: 1Q7B, ki je imel v svoji strukturi že vezan kofaktor NADPH. S programskim vmesnikom FRED\_RECECTOR smo definirali želeno območje v aktivnem mestu encima, kamor smo želeli, da se vežejo preiskovane spojine (slika 7). Določili smo notranjo prostornino,  $160 \text{ \AA}^3$ , znotraj katere naj bi se nahajali inhibitorji encima. Poleg notranje prostornine smo definirali tudi zunanjo prostornino,  $1974 \text{ \AA}^3$ , znotraj katere smo še dopustili sidranje spojin.



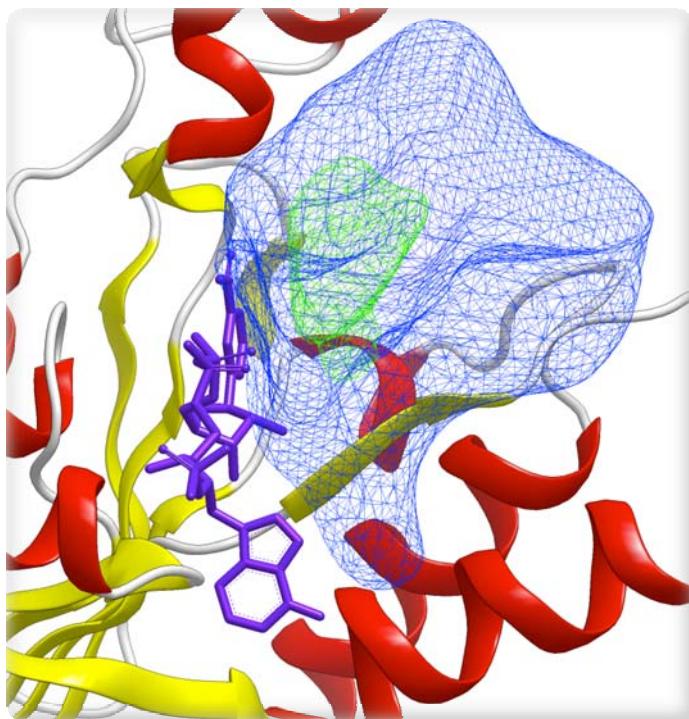
**Slika 7:** Encim FabG z vezanim kofaktorjem NADPH (rdeče) in območjem, ki smo ga določili za sidranje molekul s programom FRED (modro).

Program sam je sposoben ustrezno orientirati aminokislinske ostanke, vseeno pa smo pregledali orientacijo ključnih aminokislinskih ostankov. Program omogoča postavitev določenih omejitev v aktivnem mestu pri postavitvi spojin v aktivno mesto,

ki pa se jih nismo poslužili. Z opcijo poskusnega sidranja učinkovine v pripravljenou aktivno mesto smo preverili ustreznost vezave in kot predlogo uporabili datoteko triclosan.sdf. Program je smiselno umestil konformacijo molekule triklosana v aktivno mesto. Projekt smo shranili kot receptor1.oeb

#### 4.3. Prvo sidranje spojin v aktivno mesto encima FabG

ključni korak v procesu virtualnega rešetanja, ki vzame največ procesorskega časa, je sidranje spojin v aktivno mesto encima. V programu FRED smo uporabili knjižnico spojin rocs\_hits\_100.oeb.gz in aktivno mesto receptor.oeb. Na podlagi cenzilne funkcije je program razvrstil spojine glede na padajočo zaviralno aktivnost. Izmed najboljših 100 zadetkov smo z vizualnim pregledom določili in glede na dobavljalnost in finančno sprejemljivost naročili 18 spojin. Vezavno mesto prikazuje slika 8.



**Slika 8:** Vezavno območje pri prvem sidranju v FabG, ki smo ga določili v programu FRED. Modra barva predstavlja zunanjou prostornino, zelena pa notranjo prostornino vezavnega mesta. Vezan koencim NADPH je označen z vijolično barvo.

*Ukaz: fred –receptor receptor1.oeb.gz –dbase rocs\_hits\_100.oeb.gz –hitlist\_size 1000*

Razlaga ukazov: receptor (datoteke, kjer je opredeljeno vezavno mesto), dbase (knjižnica spojin za sidranje), hitlist\_size (želena količina prikazanih zadetkov)

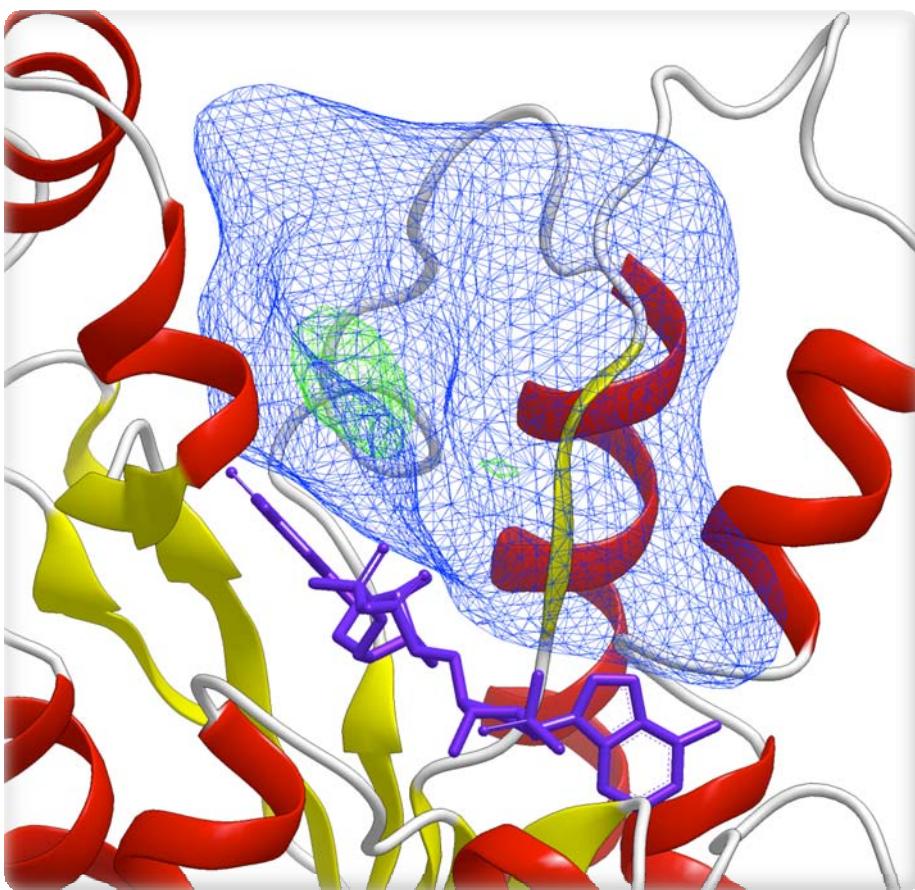
#### **4.4. Drugo sidranje spojin v aktivno mesto FabG**

V prvem sidranju smo vzeli dokaj veliko notranje območje, da bi pridobili karseda velik nabor spojin. V drugem sidranju smo notranje območje zmanjšali na  $64 \text{ \AA}^3$ , zunanje pa na  $1637 \text{ \AA}^3$ . Delali smo po istih principih kot v poglavju 4.2., spojine pa smo sidrali v aktivno mesto kot v poglavju 4.3. Vizualno smo pregledali najboljših 100 zadetkov in naročili 7 najbolje rangiranih in komercialno dostopnih spojin.

*Ukaz:* `fred -receptor receptor2.oeb.gz -dbase rocs_hits_100.oeb.gz -hitlist_size 1000`

#### **4.5. Tretje sidranje spojin v aktivno mesto FabG**

Zaradi velike fleksibilnosti aktivnega mesta encima FabG smo se odločili, da s pomočjo molekulske dinamike encim minimiziramo in sidramo v aktivno mesto minimiziranega FabG. Strukturo encima smo za molekulsko dinamiko pripravili s programom VMD. Encim smo postavili v kocko vode s proti-ioni, tako da je bil sistem nevtralen. Molekulsko dinamiko smo naredili s programom NAMD, s katerim smo izvedli minimizacijo v 10000 korakih. Strukturo minimiziranega encima smo naložili v program FRED in določili novo aktivno mesto za sidranje z notranjo prostornino  $44 \text{ \AA}^3$  in zunanjo prostornino  $1710 \text{ \AA}^3$ . Delali smo po istih principih kot v poglavju 4.2., spojine pa smo sidrali v aktivno mesto kot v poglavju 4.3. Vizualno smo pregledali najboljših 100 zadetkov in naročili 13 najbolje rangiranih in komercialno dostopnih spojin. Aktivno mesto prikazuje slika 9.



**Slika 9:** Vezavno mesto za tretje sidranje v encim FabG. Modra barva predstavlja zunano prostornino, zelena pa notranjo prostornino vezavnega mesta. Vezan koencim NADPH je označen z vijolično barvo.

*Ukaz:* fred –receptor receptor3.oeb.gz –dbase rocs\_hits\_100.oeb.gz –hitlist\_size 1000

#### 4.6. Spektrofotometrično določanje inhibitorne aktivnosti spojin na FabG

FabG v prisotnosti koencima NADPH katalizira redukcijo acetoacetil-CoA. NADPH nam služi kot kofaktor pri reakciji, ki se med reakcijo oksidira, obenem pa nam omogoča tudi spremeljanje hitrosti redukcije karbonilne skupine. Za detekcijo izkoriščamo razliko v absorpcijskem maksimumu med obema oblikama kofaktorja, ki je 259 nm za NADP<sup>+</sup> in 339 nm za NADPH. Reakcijo smo spremeljali spektrofotometrično prek merjenja koncentracije NADPH pri 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.3 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}$ ). Padec absorbance je bil premo sorazmeren količini reduciranega substrata. Pri reakciji je nujen tudi slep vzorec, saj se NADPH v raztopini spontano oksidira do NADP<sup>+</sup>.

Test smo izvedli na 96-jamičnih mikrotitrskih ploščicah (TPP), na aparaturi BioTek Synergy H4 Multi-mode microplate reader. S programom Gen5 smo določili parametre testiranja in sicer predgretje sistema na 37°C in merjenje absorbance vsakih 7 sekund skozi obdobje 300 sekund. Pri drugem testiranju smo zaradi več testiranih spojin čas med meritvami povečali na 8 sekund.

**Reagenti:**

Pufer: 100 mM fosfatni pufer, pH 7.0, ki vsebuje kot kotočilo 5% DMSO

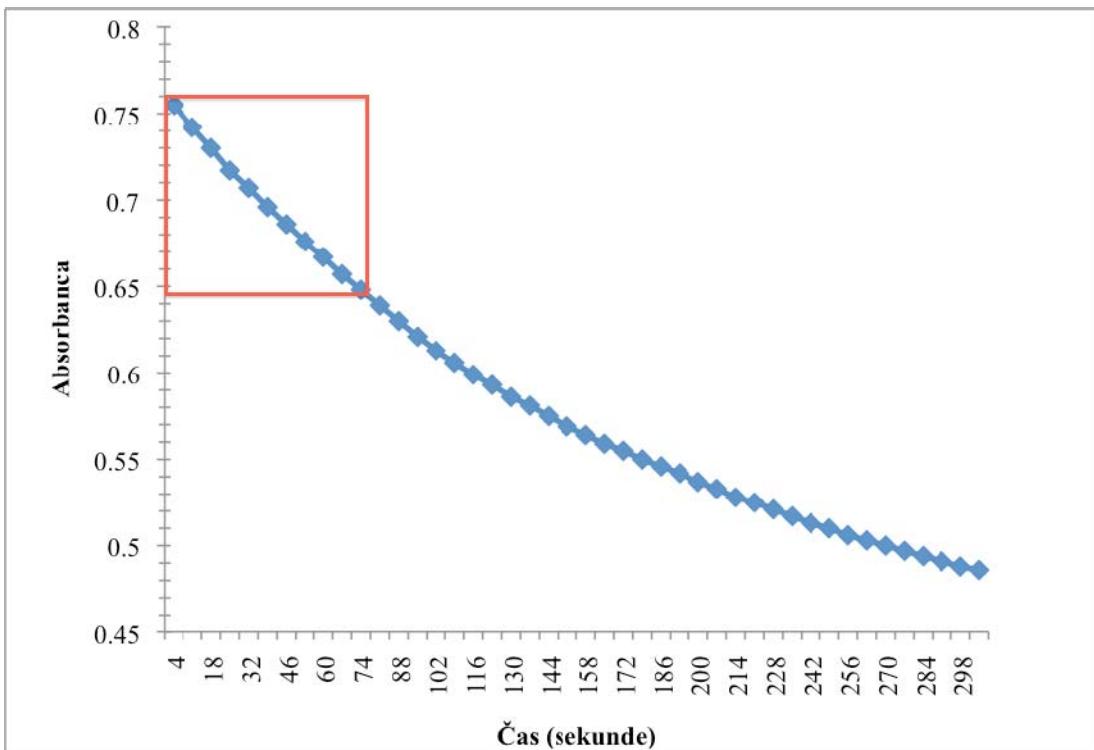
Substrat: 150  $\mu$ M Acetoacetil-CoA

Encim: 1  $\mu$ g encima FabG

Koencim: 300  $\mu$ M NADPH

**Postopek:**

Pripravili smo 10 mM osnovne raztopine spojin v DMSO. V reakcijsko zmes so dali 8.5  $\mu$ L raztopine spojine v DMSO (ali samo DMSO v primeru kontrole), 110  $\mu$ L NADPH, raztopljenega v fosfatnem pufru in 0.5  $\mu$ L FabG. Reakcijo smo začeli s dodatkom 50  $\mu$ L acetoacetil-CoA in kontinuirano spremljali absorbanco 300 sekund. Stopnja oksidacije NADPH brez dodatka acetoacetil-CoA nam je služila kot slepa vrednost in smo jo odsteli od eksperimentalne vrednosti, dobljene z dodatkom acetoacetil-CoA. Določili smo konstanto oksidacije NADPH in izračunali % inhibicije po enačbi  $100 - [(v_0(z \text{ inhibitorjem})/v_0(\text{brez inhibitorja})) \times 100]$ <sup>6</sup>. Začetno linearno območje smo definirali kot časovno območje, kjer so imeli naši podatki vsaj 99,9 ujemanje s linearno trendno črto. Določili smo 76 sekund za prvo testiranje in 74 sekund za drugo testiranje, kar prikazuje tudi slika 10.



Slika 10: Primer grafa absorbance v odvisnosti od časa pri naših *in vitro* poskusih. Z rdečo je označeno linearno območje, ki smo ga upoštevali za izračun hitrosti razpada substrata.

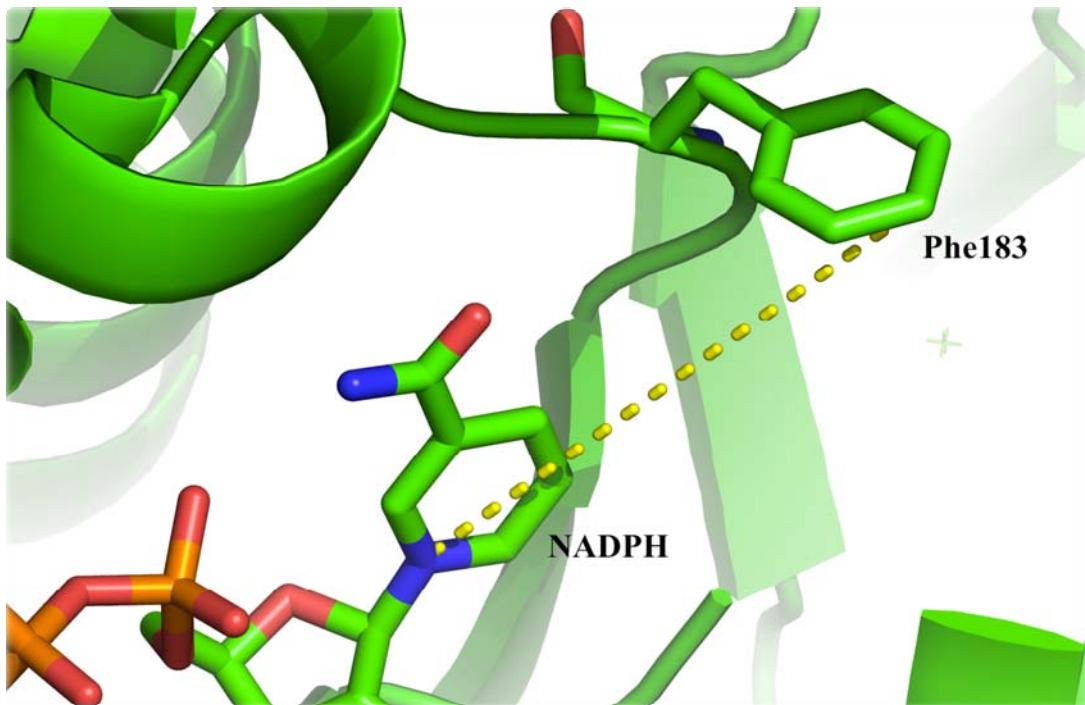
## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. Rezultati načrtovanja knjižnice in sidranja

V prvem koraku smo filtrirali knjižnico spojin Zinc\_druglike, ki je vsebovala 10.600.000 spojin in jo s programom FILTER skrčili na 8.000.000 spojin. S programom ROCS smo izvedli rešetanje na podlagi volumna in oblike glede na molekulo triklosana in obdržali 100.000 najbolje ocenjenih spojin. Te smo s programom FRED v treh ločenih virtualnih sidranjih sidrali v aktivno mesto FabG in s programom VIDA pregledali 100 najboljših zadetkov. Glede na razpoložljivost, kemijsko ustreznost in finančno sprejemljivost smo v prvem sidranju naročili 18, pri drugem 7 in pri tretjem 13 spojin, ki smo jih potestirali *in vitro* na encimu FabG. 4 spojine iz prvega in 2 spojini iz drugega sidranja so pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  dosegle postavljeno mejo 20% inhibicije encima.

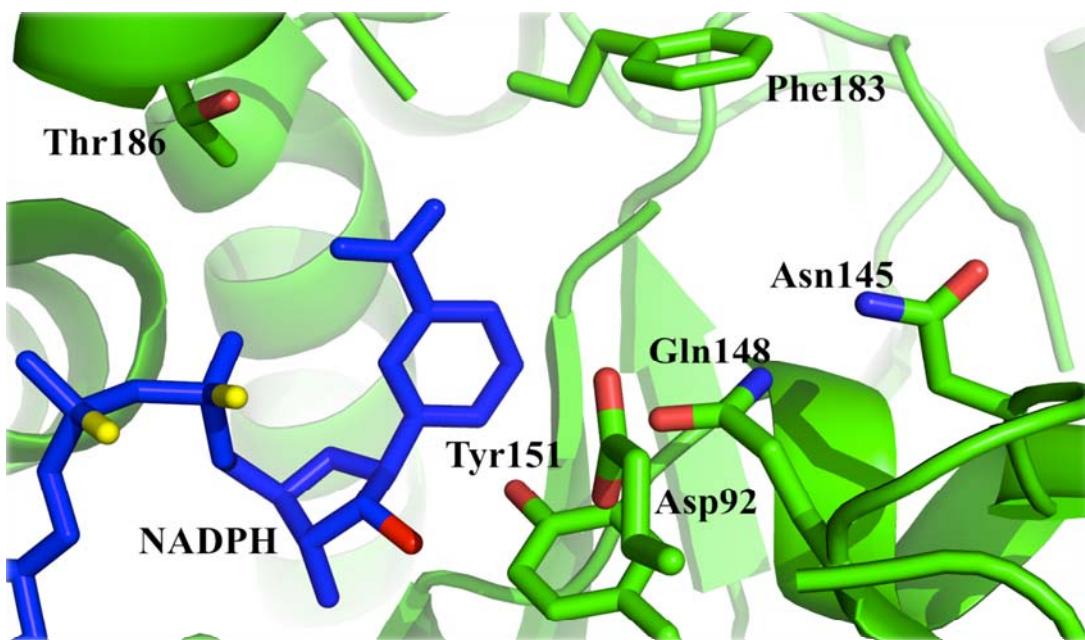
Na žalost v PDB ne obstaja kristalna struktura encima FabG z vezanim inhibitorjem, zato smo lahko določili način vezave zaviralcev samo preko predvidevanja programa FRED in preko kemijske intuicije. Aktivno mesto je dokaj lipofilno, saj je fiziološko

namenjeno redukciji zelo lipofilnih molekul – prekurzorjev maščobnih kislin. Aktivno mesto močno definirata nikotinamidna skupina NADPH in Phe 183. Če želimo z eno spojino ciljati na interakcije tako z NADPH in Phe 183, potrebuje ta spojina dve povezani lipofilni področji, po možnosti aromatski. Te lastnosti izkazujejo praktično vse testirane spojine. Skupini sta oddaljeni približno 10 Å in sta pod kotom 90° druga na drugo, kar prikazuje slika 11.



**Slika 11:** Pozicija nikotinamidnega dela NADPH in PHE 183 v aktivnem mestu FabG. Rumena prekinjena črta prikazuje razdaljo med skupinama.

Program FRED je pri izdelavi vezavnega področja upošteval vpliv konformacije naslednjih aminokislinskih ostankov: Asn 86, Thr 90, Asn 93, Thr 109, Asn 110, Ser 138, Asn 145, Asn 150, Tyr 151, Thr 186, Thr 189. Predvidevali smo, da bodo ti aminokislinski ostanki znatno sodelovali pri tvorbi H-vezi s testiranimi spojinami. Pri našem delu smo opazili možnost tvorbe vodikovih vezi predvsem z aminokislinskimi ostanki Tyr 151, Gln 148, Asn 145, Thr 186 in Asp 92. Pomembno vlogo pri potencialni tvorbi H-vezi pa ima tudi kofaktor NADPH, predvsem s fosfatno skupino in sladkornima –OH skupinama. Slika 12 prikazuje značilnosti aktivnega mesta.



**Slika 12:** Razporeditev skupin, ki tvorijo vodikove vezi s testiranimi spojinami v aktivnem mestu FabG. Z modro barvo je označen kofaktor NADPH, z označenimi aktivnimi funkcionalnimi skupinami (sladkorna –OH rdeča barva, fosfatni skupini rumena barva).

### 5.1.1. Rezultati prvega *in vitro* testiranja na encimu FabG

Pri prvem *in vitro* testiranju smo naročili 18 spojin, ki smo jih pridobili s prvim sidranjem pripravljene knjižnice spojin v encim FabG. Štiri spojine so dosegle želeno inhibitorno vrednost 20% in sicer spojini **7** in **9**, ki sta derivata 4,5-dihidro-2H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-ola, spojina **11**, ki je derivat bifenil-3-karboksilne kisline ter spojina **16**, ki je strukturno od vseh zadetkov najbolj podobna triklosanu. Zadetki so prikazani v preglednici III, neaktivne spojine pa v prilogi.

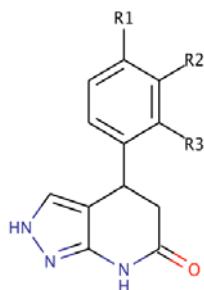
**Preglednica III:** Najboljši zadetki prvega in vitro testiranja na encimu FabG iz E- Coli.

Spojina	ZINC koda	Struktura	Inhibicija (%)
<b>7</b>	ZINC20732790		24.8
<b>9</b>	ZINC15083315		25.7
<b>11</b>	ZINC32541268		34.3
<b>16</b>	ZINC8063564		21.6

Med testiranimi spojinami je bilo 6 analogov 4,5-dihidro-2H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-ola in sicer spojine **3**, **4**, **6**, **7**, **8**, **9**, med katerimi sta bili najbolj aktivni spojini **7** in **9**. Ti dve spojini nimata tako lepega prileganja aromatskih obročev glede na nikotinamid iz NADPH in Phe 183 kot spojina **11**, tvorita pa obe spojini H-vez s Tyr 151. Poleg tega program FRED predvideva še tvorbo H-vezi s fosfatno skupino NADPH in sladkorno -OH skupino NADPH. Višjo aktivnost izkazuje tudi spojina **6**, ki pa je najverjetneje pogojena z boljšim prileganjem spojine v aktivno mesto zaradi velike bromo skupine.

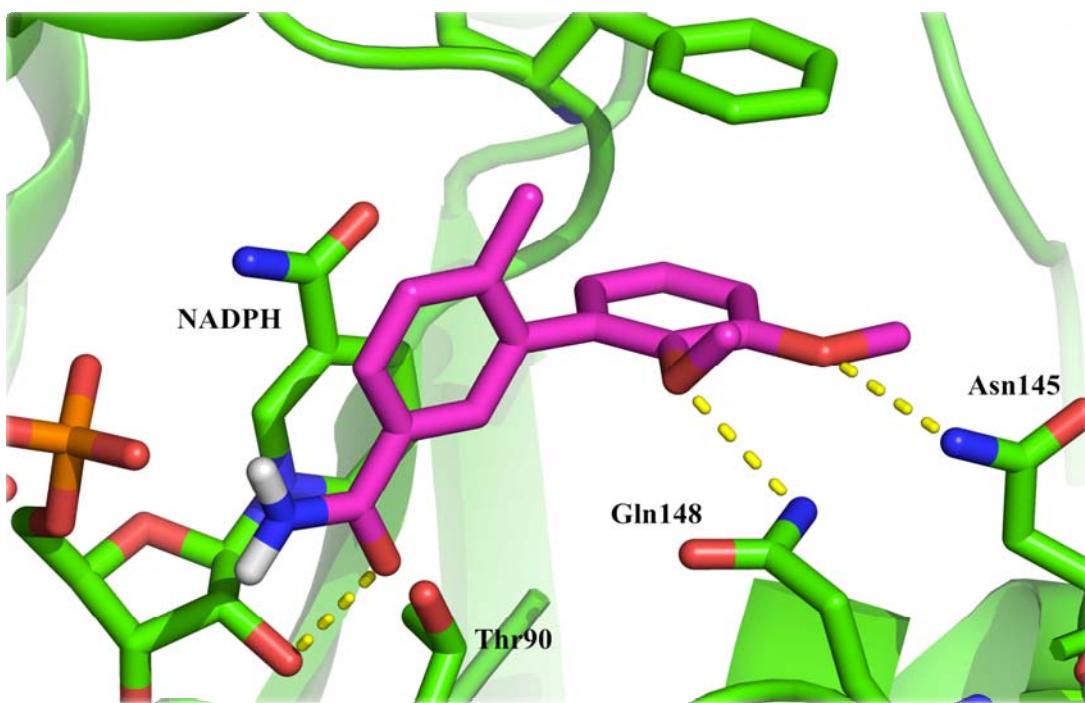
Spojini **7** n **9** imata za razliko od ostalih analogov na p-mestu fenilnega obroča vezano hidroksi skupino, ki je verjetno odgovorna za boljšo aktivnost. Program FRED sicer ne predvideva H-vezi hidroksilne skupine z vezavnim mestom, vendar pa je možno, da se med vezavo spojine spremeni konformacija encima in se s tem vzpostavijo nove interakcije. Primerjavo aktivnosti prikazuje preglednica IV.

**Preglednica IV:** Primerjava *in vitro* aktivnosti spojin (3-4, 6-9)



Spojina	R1	R2	R3	FRED score	Inhibicija (%)
<b>3</b>	-H	-H	-F	-66.27	-9.6
<b>4</b>	-H	-OMe	-OMe	-72.99	-0.2
<b>6</b>	-H	-H	-Br	-65.86	16.1
<b>7</b>	-OH	-H	-H	-65.29	24.8
<b>8</b>	-H	-OMe	-H	-72.21	5.9
<b>9</b>	-O-CH <sub>2</sub> -O-		-H	-66.73	25.7

Inhibitorno aktivnost spojine **11** lahko pojasnimo z zelo dobrim prileganjem bifenilne skupine na nikotinamidni del NADPH in Phe 183, poleg tega pa lahko tvori 3 vodikove vezi. Amidni kisik tvori vodikovo vez z -OH skupino sladkorne enote NADPH, m-metoksi skupina z Asn 145 in o-metoksi skupina z Gln 148. V konformaciji, ki jo je predvidel program FRED (slika 13), amidna -NH<sub>2</sub> skupina ne more tvoriti H-vezi. V kolikor bi prišlo do rotacije, bi bila omogočena tvorba vezi s fosfatno skupino NADPH in Thr 90.



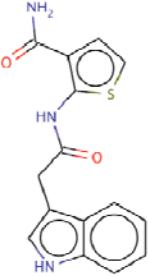
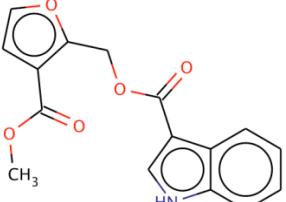
**Slika 13:** Najbolj aktivna spojina prvega *in vitro* testiranja, spojina **11** (vijolično), sidrana v aktivno mesto encima FabG. Vodikove vezi so prikazane z rumenimi prekinjenimi črtami.

Spojina **16** ima osnovni skelet zelo podoben difeniletrsksemu triklosana. To ji omogoča dobre hidrofobne interakcije z nikotinamidnim delom NADPH in Phe 183, vodikove vezi pa lahko tvori med nitro skupino in Tyr 151 ter N-oksidno skupino in Gln 148.

### 5.1.2. Rezultati drugega *in vitro* testiranja na encimu FabG

Pri drugem *in vitro* testiranju smo uporabili 7 spojin iz drugega in 13 spojin iz tretjega sidranja. Uporabili smo enake minimalne inhibitorne zahteve kot pri prvem in sicer 20% zmanjšanje aktivnosti encima pri koncentraciji 500  $\mu$ M. Tem pogojem sta ustrezali dve spojini iz drugega sidranja in sicer spojina **21**, ki je derivat indol-3-ocetne kisline, in spojina **22**, ki je derivat indol-3-karboksilne kisline. Spojine, ki smo jih pridobili s tretjim sidranjem v aktivno mesto FabG, niso imele inhibitornih aktivnosti. Zadetka iz drugega *in vitro* testiranja prikazuje preglednica V, neaktivne spojine obeh sidranj pa so prikazane v prilogi.

**Preglednica V:** Najboljši zadetki drugega *in vitro* testiranja na encimu FabG iz *E. Coli*.

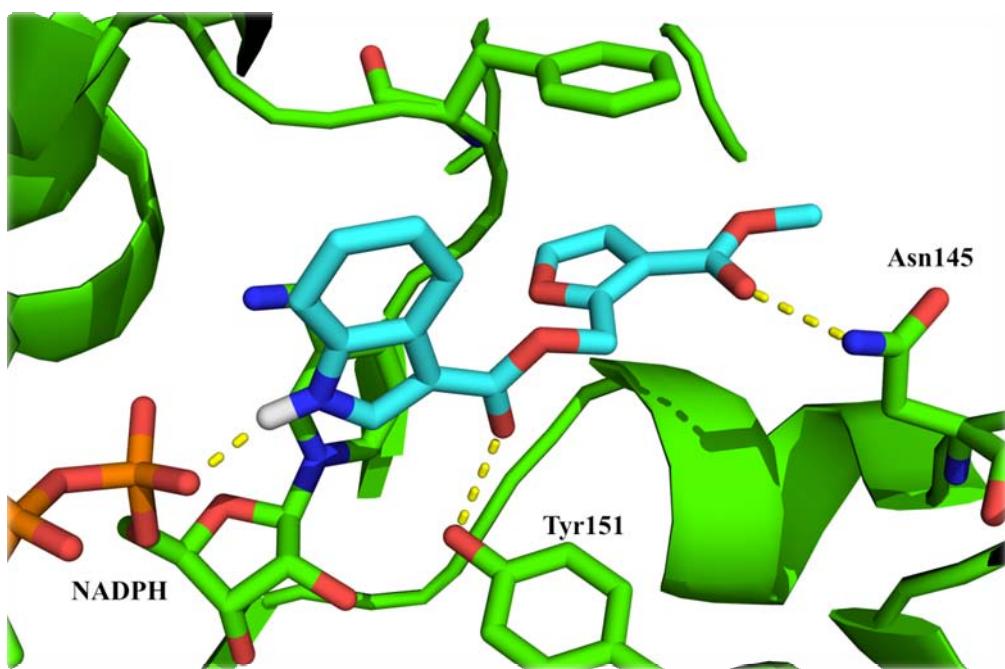
Spojina	ZINC koda	Struktura	Inhibicija (%)
<b>21</b>	ZINC2662217		22.2
<b>22</b>	ZINC22473657		33.1

Aktivnost spojine **21** lahko pojasnimo s tem, da poleg hidrofobnih interakcij z nikotinamidnim delom NADPH in Phe 183 tvori vodikove vezi s fosfatno skupino NADPH, Tyr 151 in Asp 92. Karbamidna skupina v konformaciji, ki jo je sidral program FRED, ne predvideva tvorb H-vezi, vendar pa bi ob določeni rotaciji skupine lahko prišlo do vzpostavitve H-vezi z bližnjimi aminokislinskimi ostanki (Gly 182, Ser 138) ali celo karbamidno skupino NADPH.

Spojina je v drugem *in vitro* testiranju dala najboljše rezultate, kar je verjetno posledica zelo dobrega ujemanja spojine z nikotinamidnim delom NADPH in Phe 183 in tvorbe treh H-vezi. Molekula tvori H-vez med aminsko skupino indola s fosfatno skupino NADPH, poleg tega pa še s Tyr 151 in Asn 145.

Program FRED predvideva zelo podobno vezavo v aktivno mesto encima, kar je skladno s strukturo obeh molekul. Obe imata 2 hidrofobni območji, povezani preko verige treh atomov, ki tvorita približno pravi kot. Struktura povezovalne verige je odgovorna za zasuk v vezavi. Amindni dušik pri spojini **21** molekulo nekoliko zasuče, tako da je možna vzpostavitev H-vezi z Asp 92, spojina **22** pa se orientira glede na H-vez z Asn 145 (slika 14).

Tudi spojina **19**, ki je strukturno zelo podobna obema zadetkom, je imela dokaj visoko inhibitorno vrednost (17.2%). V aktivno mesto se veže z enakimi H-vezmi kot spojina **22**, vendar pa para hidroksimetilna skupina na fenilnem obroču ni optimalno pozicionirana.



Slika 14: Najbolj aktivna spojina drugega *in vitro* testiranj, spojina 22 (svetlomodra barva), sidрана v aktivno mesto FabG. Vodikove vezi so prikazane s rumenimi prekinjenimi črtami.

### 5.1.3. Komentar rezultatov testiranja spojin

S prvim in drugim sidranjem smo pridobili aktivne spojine, tretje sidranje pa na žalost ni prineslo aktivnih spojin. Glede na to, da smo v tem primeru uporabili molekulsko dinamiko za minimizacijo proteina, lahko zaključimo, da tovrsten princip ne deluje na encimu FabG.

Inhibitorne vrednosti, ki smo jih pridobili pri testiranju, so daleč od želenih vrednosti v nizkem mikromolarnem koncentracijskem območju, so pa primerljive z rezultati drugih raziskovalcev. FabG je encim, za katerega še ni razvitetih učinkovitih inhibitorjev, zato so pozitivni rezultati še kako dobrodošli.

Kar je pri naših aktivnih spojinah zelo obetajoče, je njihova molekulska masa, ki se giblje med 220 in 300. Do meje 500, znotraj katere so drug\_like spojine, je tako še veliko manevrskega prostora. Možna je dodatna derivatizacija, s tem boljša vezava v aktivno mesto encima ter posledično boljša inhibitorna aktivnost.

### 5.1.4. Določanje čistosti in istovetnosti spojin

Istovetnost spojin je bila zagotovljena s strani dobaviteljev in je bila določena s pomočjo NMR.

Čistost spojin je bila prav tako določena s strani dobaviteljev in sicer s metodo tekočinske kromatografije, sklopljene z masno spektrografijo. Zagotovljena je vsaj 95% čistost spojin.

## 6 SKLEP

Z virtualnim rešetanjem na podlagi liganda in na podlagi strukture tarčnega encima smo odkrili nove zaviralce encima FabG iz *E. Coli*. Pokazali smo, da lahko z ustreznim pripravljenim knjižnico spojin, primernim filtriranjem, pravilno izbiro primerjalnega liganda in s pomočjo virtualnega rešetanja močno obogatimo začetno knjižnico spojin. V treh ločenih sidranjih smo pridobili 38 spojin, ki smo jih *in vitro* testirali na encimu FabG in ugotovili, da 6 spojin pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  inhibira encim. Najboljša zadetka sta bili spojina **11** in spojina **22**.

Ugotovili smo, da z metodo minimalizacije proteina FabG s pomočjo molekulske dinamike ne pridobimo aktivnih spojin.

Postavili smo tudi strukturne zahteve za zaviralce encima FabG. Spojine morajo imeti v svoji strukturi dve med seboj povezani lipofilni območji, ki interagirata z nikotinamidno skupino NADPH in Phe 183 in tvorita približno pravi kot.

Definirali smo tudi skupine, ki tvorijo vodikove vezi z inhibitorji encima FabG. Najpogosteje so spojine interagirale s Tyr 151, sladkorno enoto NADPH in fosfatno skupino NADPH. Ostale skupine, ki so bile pogosto udeležene pri vezavi, so bile Gln 148, Asn 145, Thr 186 in Asp 92.

Glede na primerjavo množice strukturnih nalogov 4,5-dihidro-2H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-ola smo določili, da potrebujejo za aktivnost na para mestu fenilnega obroča hidroksi oziroma alkiloksi skupino.

Pridobili smo zaviralce encima FabG z nizko molekulske maso (med 220 in 300 Dal), iz katerih je možno z derivatizacijo sintetizirati močnejše zaviralce encima FabG.

## 7 LITERATURA

1. Chopra I, Schofield C, Everett M, O'Neill A, Miller K, Wilcox M, et al: Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. Lancet Infect Dis. 2008; 8(2) :133–9.
2. Wenzel RP. The antibiotic pipeline--challenges, costs, and values: N Engl J Med 2004; 351(6): 523–6.
3. Jabes D: The antibiotic R&D pipeline: an update. Current Opinion in Microbiology 2011; 14(5): 564–9.
4. Projan SJ, Bradford PA: Late stage antibacterial drugs in the clinical pipeline. Current Opinion in Microbiology 2007; 10(5): 441–6.
5. Morel CM, Mossialos E: Stoking the antibiotic pipeline. BMJ 2010; 340: c2115–c2115.
6. Fischbach MA, Walsh CT: Antibiotics for Emerging Pathogens. Science 2009; 325(5944): 1089–93.
7. <http://www.eur-intafar.eu> Dostopano: oktober 2012
8. Höglberg LD, Heddini A, Cars O: The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. Trends in Pharmacological Sciences 2010; 31(11): 509–15.
9. Parsons JB, Rock CO: Is bacterial fatty acid synthesis a valid target for antibacterial drug discovery?. Current Opinion in Microbiology 2011; 14(5): 544–9.
10. Schujman GE, de Mendoza D: Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. Current Opinion in Microbiology 2008; 11(2): 148–52.
11. Price AC, Zhang Y-M, Rock CO, White SW: Cofactor-induced conformational rearrangements establish a catalytically competent active site and a proton relay conduit in FabG. Structure 2004; 12(3): 417–28.
12. Kristan K, Bratkovic T, Sova M, Gobec S, Prezelj A, Urleb U: Novel inhibitors of beta-ketoacyl-ACP reductase from Escherichia coli. Chem Biol Interact 2009; 178(1-3): 310–6.
13. Price AC, Zhang YM, Rock CO, White SW: Structure of beta-ketoacyl-[acyl carrier protein] reductase from Escherichia coli: negative cooperativity and its structural basis. Biochemistry 2001; 40(43): 12772–81.

14. Zhang Y-M, Rock CO: Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem* 2004; 279(30): 30994–1001.
15. Wu D, Wu X-D, You X-F, Ma X-F, Tian W-X: Inhibitory effects on bacterial growth and beta-ketoacyl-ACP reductase by different species of maple leaf extracts and tannic acid. *Phytother Res* 2010; 24 Suppl 1: S35–41.
16. Zhang F, Luo S-Y, Ye Y-B, Zhao W-H, Sun X-G, Wang Z-Q, et al: The antibacterial efficacy of an aceraceous plant [Shantung maple (*Acer truncatum* Bunge)] may be related to inhibition of bacterial  $\beta$ -oxoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2008; 51(2): 73.
17. Klebe G: Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discov Today* 2006; 11(13-14): 580–94.
18. Shoichet BK.: Virtual screening of chemical libraries. *Nature* 2004; 432(7019): 862–5.
19. Bajorath J: Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11): 882–94.
20. Guido RVC, Oliva G, Andricopulo AD: Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Curr Med Chem* 2008; 15(1): 37–46.
21. Tang YT, Marshall GR: Virtual screening for lead discovery. *Methods Mol Biol* 2011; 716: 1–22.
22. Davis AM, Teague SJ, Kleywegt GJ: Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. *Angew Chem Int Ed Engl* 2003; 42(24): 2718–36.
23. Santiago DN, Pevzner Y, Durand AA, Tran M, Scheerer RR, Daniel K, et al: Virtual target screening: validation using kinase inhibitors. *J Chem Inf Model* 2012; 52(8): 2192–203.
24. Ripphausen P, Nisius B, Peltason L, Bajorath J. Quo vadis, virtual screening? A comprehensive survey of prospective applications. *J Med Chem* 2010; 53(24): 8461–7.
25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/> Dostopano: november 2012
26. Congreve M, Murray CW, Blundell TL: Keynote review: Structural biology and drug discovery. *Drug Discovery Today* 2005; 10(13): 895–907.
27. <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/MoreonSMILES.html> Dostopano: november 2012
28. <http://www.eyesopen.com/omega> Dostopano: november 2012
29. [http://cds.dl.ac.uk/cds/interface\\_and\\_utilities/babel.html](http://cds.dl.ac.uk/cds/interface_and_utilities/babel.html) Dostopano: november 2012

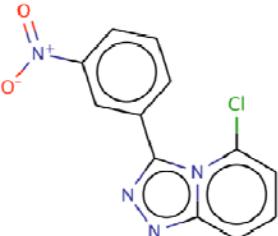
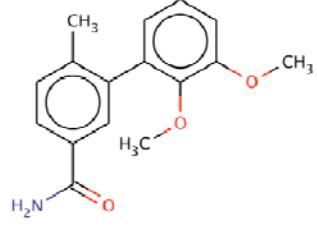
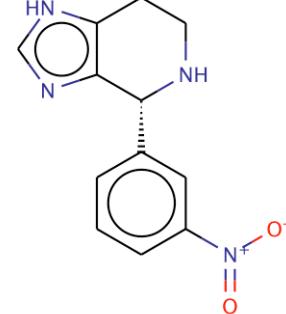
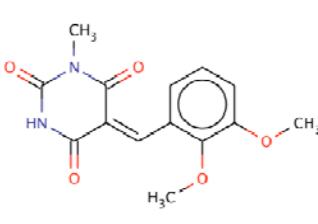
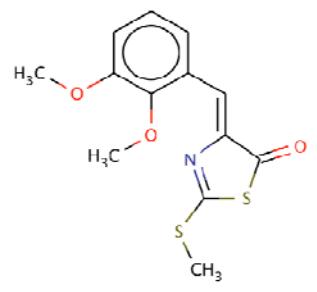
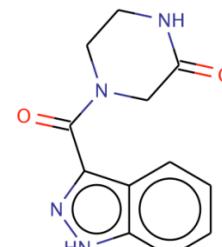
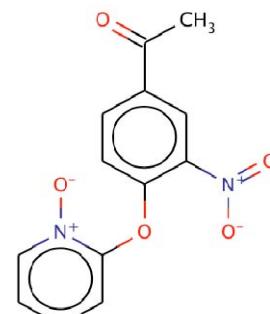
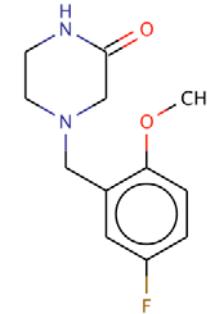
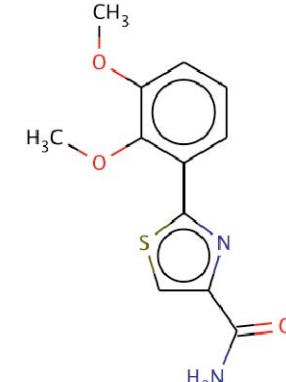
30. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG: ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2012; 52(7): 1757–68.
31. Cheng T, Li Q, Zhou Z, Wang Y, Bryant SH: Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review. *AAPS J* 2012; 14(1): 133–41.
32. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 23: 3-25.
33. O’Shea R, Moser HE: Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *J Med Chem* 2008; 51(10): 2871–8.
34. Oprea TI, Davis AM, Teague SJ, Leeson PD: Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. *J Chem Inf Comput Sci* 2001; 41(5): 1308–15.
35. Feng BY, Shoichet BK: A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 550–3.
36. <http://www.eyesopen.com/filter> Dostopano: november 2012
37. Nicholls A, McGaughey GB, Sheridan RP, Good AC, Warren G, Mathieu M, et al: Molecular shape and medicinal chemistry: a perspective. *J Med Chem* 2010; 53(10): 3862–86.
38. Miller MA: Chemical database techniques in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(3): 220–7.
39. Vogt M, Stumpfe D, Geppert H, Bajorath J: Scaffold hopping using two-dimensional fingerprints: true potential, black magic, or a hopeless endeavor? Guidelines for virtual screening. *J Med Chem* 2010; 53(15): 5707–15.
40. Mason JS, Good AC, Martin EJ: 3-D Pharmacophores in Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design* 2001; 7(7): 567–97.
41. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. *J. Comb. Chem.* 1999 Jan 1;1(1):55–68.
42. Duch W, Swaminathan K, Meller J: Artificial intelligence approaches for rational drug design and discovery. *Curr Pharm Des* 2007; 13(14): 1497–508.
43. <http://www.eyesopen.com/rocs> Dostopano: november 2012
44. Teague SJ: Implications of protein flexibility for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003; 2(7): 527–41.

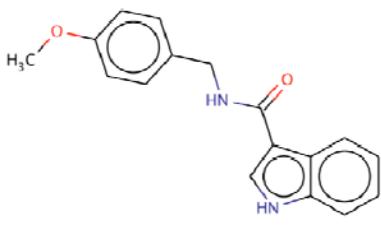
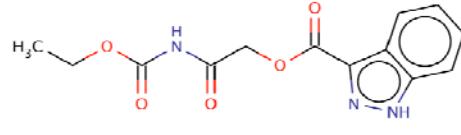
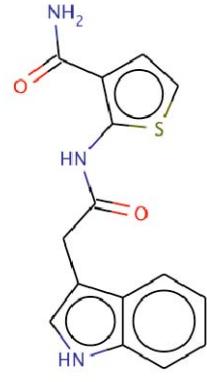
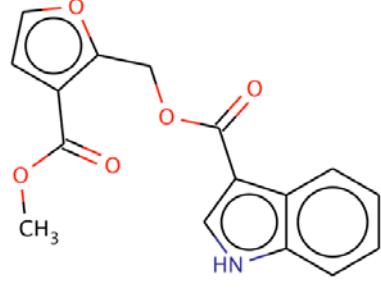
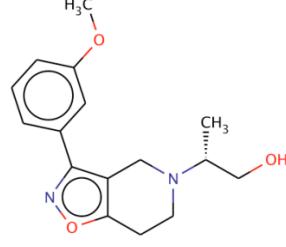
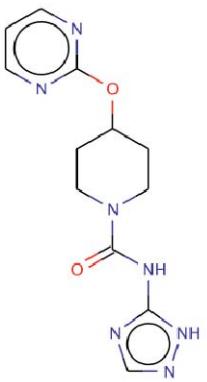
45. Durrant J, McCammon JA: Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biology* 2011; 9(1): 71.
46. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J: Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(11): 935–49.
47. Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M: Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011; 7(2): 146–57.
48. Günther J, Bergner A, Hendlich M, Klebe G: Utilising Structural Knowledge in Drug Design Strategies: Applications Using Relibase. *Journal of Molecular Biology* 2003; 326(2): 621–36.
49. Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE: Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J Med Chem* 2006; 49(20): 5851–5.
50. Ferreira RS, Simeonov A, Jadhav A, Eidam O, Mott BT, Keiser MJ, et al: Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J Med Chem* 2010; 53(13): 4891–905.
51. <http://www.eyesopen.com/docs/oedocking/current/html/fred.html> Dostopano: november 2012
52. <http://www.eyesopen.com/vida> Dostopano: november 2012
53. <http://www.pymol.org/> Dostopano: november 2012
54. <http://www.molinspiration.com/> Dostopano: november 2012

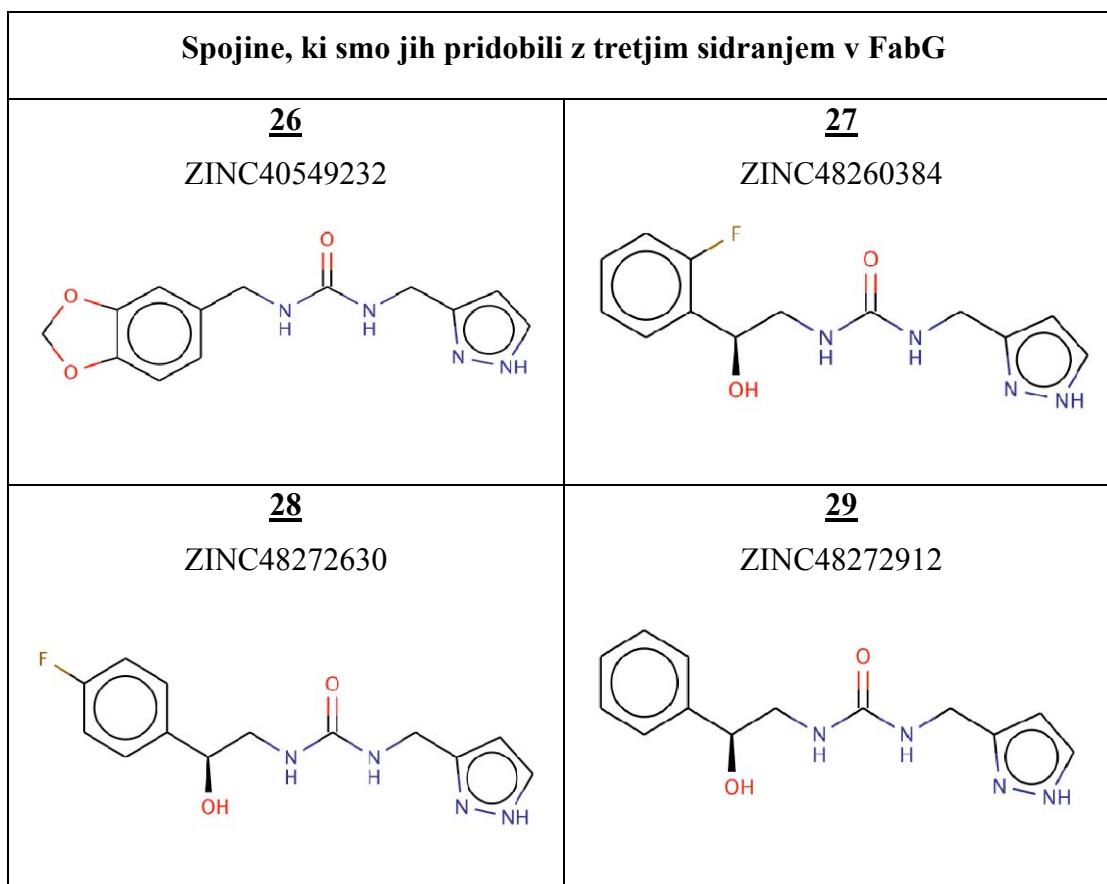
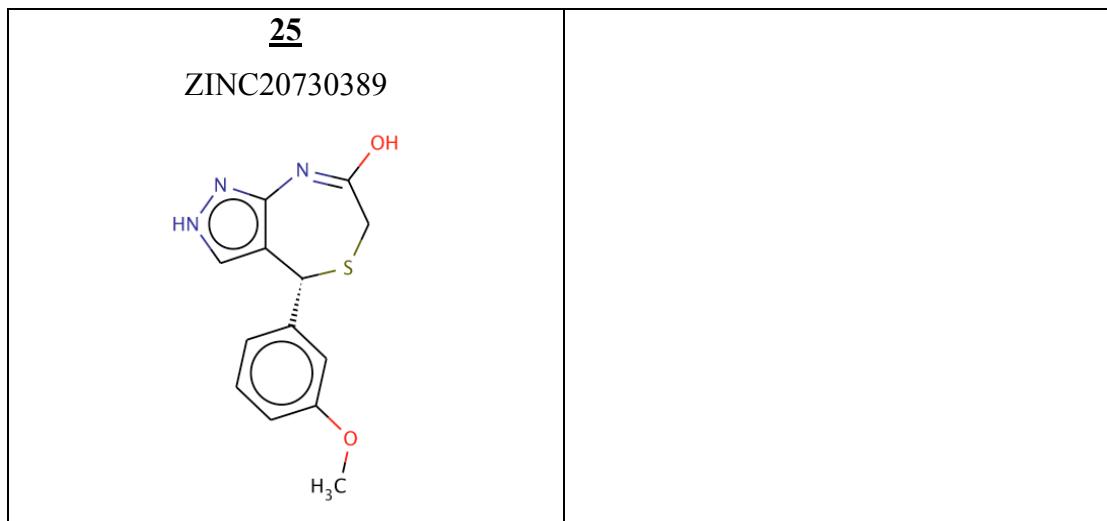
## Priloga 1

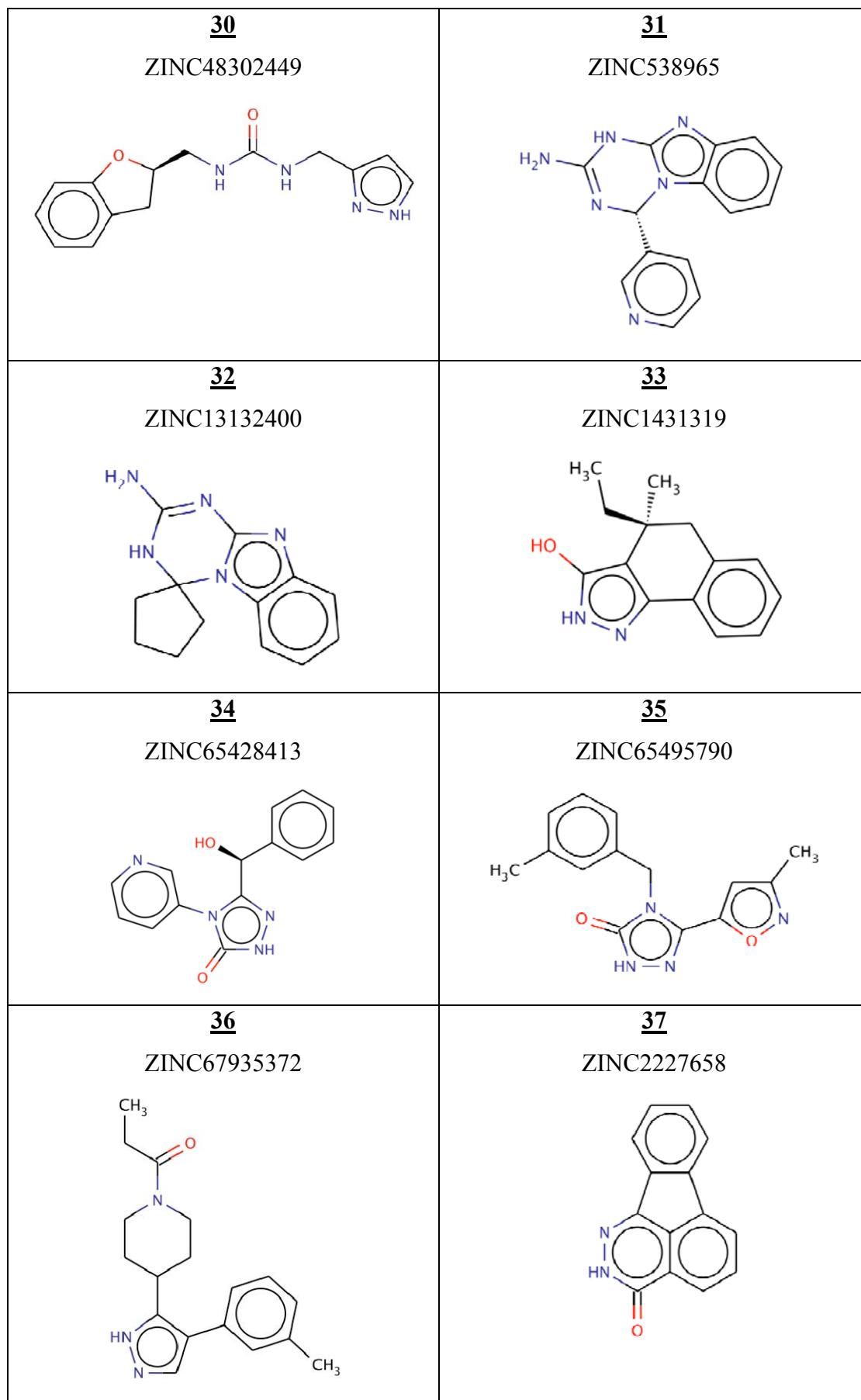
Preglednica struktur spojin ni ZINC kode, ki smo jih uporabili za *in vitro* testiranje na encimu FabG iz *E. Coli*.

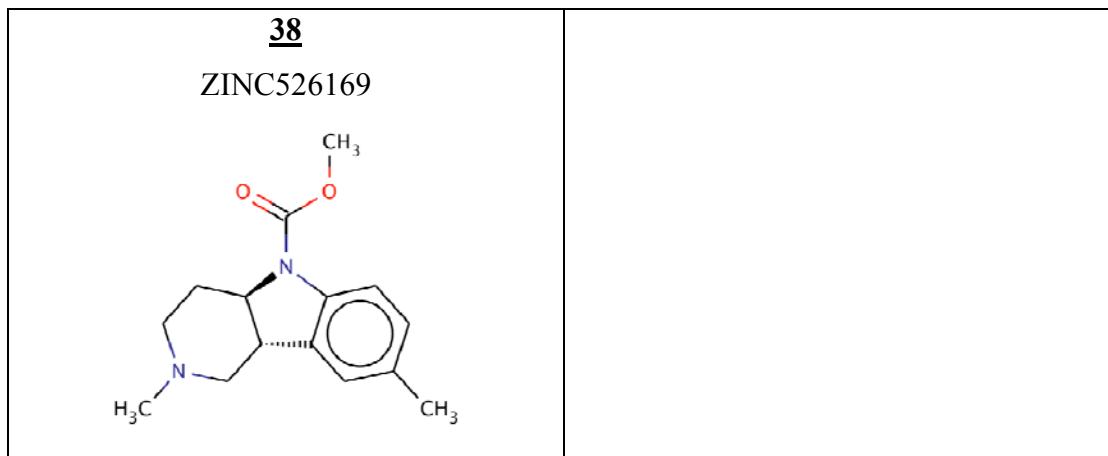
Spojine, ki smo jih pridobili s prvim sidranjem v FabG		
<b>1</b> ZINC2707141 	<b>2</b> ZINC3338816 	<b>3</b> ZINC20721958 
<b>4</b> ZINC20744771 	<b>5</b> ZINC492552 	<b>6</b> ZINC20721108 
<b>7</b> ZINC20732790 	<b>8</b> ZINC20731095 	<b>9</b> ZINC15083315 

<b>10</b> ZINC92207 	<b>11</b> ZINC32541268 	<b>12</b> ZINC197259 
<b>13</b> ZINC440833 	<b>14</b> ZINC458547 	<b>15</b> ZINC12525661 
<b>16</b> ZINC8063564 	<b>17</b> ZINC7844219 	<b>18</b> ZINC44025500 

Spojine, ki smo jih pridobili z drugim sidranjem v FabG	
<b>19</b> ZINC1399479 	<b>20</b> ZINC5827032 
<b>21</b> ZINC2662217 	<b>22</b> ZINC22473657 
<b>23</b> ZINC39500492 	<b>24</b> ZINC23311026 







## Priloga 2

Podatki o molekulski masi, vrednosti cenilne funkcije Chemgauss3 (program FRED), prioritetno mesto v programu FRED in *in vitro* inhibitorni aktivnosti testiranih spojin.

Številka spojine	Molekulska masa	Chemgauss3 score	Prioritetno mesto (FRED)	Inhibicija (%)
<b>Prvo sidranje</b>				
<b><u>1</u></b>	277.7	-66.40	36.	6.4
<b><u>2</u></b>	255.2	-65.59	53.	7.7
<b><u>3</u></b>	231.2	-66.27	37.	-9.6
<b><u>4</u></b>	273.3	-72.99	1.	-0.2
<b><u>5</u></b>	260.2	-65.30	61.	-2.7
<b><u>6</u></b>	292.1	-65.86	45.	16.1
<b><u>7</u></b>	229.2	-65.29	62.	24.8
<b><u>8</u></b>	243.3	-72.21	2.	5.9
<b><u>9</u></b>	257.2	-66.73	32.	25.7
<b><u>10</u></b>	274.7	-65.38	59.	3.9
<b><u>11</u></b>	271.3	-68.40	12.	34.3
<b><u>12</u></b>	244.2	-67.21	25.	14.6
<b><u>13</u></b>	290.3	-65.19	66.	7.7
<b><u>14</u></b>	295.4	-66.46	34.	14.5
<b><u>15</u></b>	244.2	-65.83	46.	17.0
<b><u>16</u></b>	274.2	-65.82	47.	21.6

<u>17</u>	238.3	-65.96	44.	11.9
<u>18</u>	264.3	-65.46	56.	-30.2
<b><u>Drugo sidranje</u></b>				
<u>19</u>	280.321	-79.08	20.	17.22
<u>20</u>	291.259	-79.54	13.	6.24
<u>21</u>	299.348	-80.13	11.	22.22
<u>22</u>	299.278	-79.45	15.	33.05
<u>23</u>	289.35	-80.29	9.	7.82
<u>24</u>	288.285	-83.57	1.	-3.26
<u>25</u>	275.326	-81.15	3.	-11.33
<b><u>Tretje sidranje</u></b>				
<u>26</u>	274.275	-73.84	4.	-14.08
<u>27</u>	278.282	-74.61	1.	1.04
<u>28</u>	278.282	-71.79	18.	-5.30
<u>29</u>	260.292	-73.44	6.	4.30
<u>30</u>	272.302	-72.51	11.	3.64
<u>31</u>	265.293	-71.54	26.	1.99
<u>32</u>	242.3	-71.34	30.	-7.22
<u>33</u>	227.282	-71.48	29.	8.10
<u>34</u>	268.271	-73.52	5.	4.21
<u>35</u>	270.287	-71.71	22.	4.12
<u>36</u>	297.395	-71.93	17.	-12.49
<u>37</u>	220.226	-71.49	28.	4.48
<u>38</u>	261.339	-71.74	21.	-8.78