

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**URBAN BRUMEN**

**ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV UNDEKAPRENI  
PIROFOSFATNE SINTAZE Z RAČUNALNIŠKIMI METODAMI**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**URBAN BRUMEN**

**ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV UNDEKAPRENILOV  
PIROFOSFATNE SINTAZE Z RAČUNALNIŠKIMI METODAMI**

SEARCHING FOR NEW INHIBITORS OF UNDECAPRENYL  
PYROPHOSPHATE SYNTHASE WITH COMPUTATIONAL METHODS

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZitetni študijski program FARMACIJE

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm., in somentorstvom dr. Sama Turka, mag.farm.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Stanislavu Gobcu in dr. Samu Turku za mentorstvo, nasvete in vso pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Posebej se zahvaljujem Anji in družini – mami, atu, bratu, Lei in našemu najmlajšemu Janu, da so mi v času študija stali ob strani in nad mano niso obupali.

Velika zahvala gre tudi vsem kolegicam in kolegom iz Fakultete za farmacijo in vsem generacijam DrugDealer-ja, s katerimi smo skupaj doživeli nešteto zanimivih dogodivščin in pripetljajev ter tako poskrbeli, da so bila študentska leta zares nepozabna.

### **Izjava**

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

Urban Brumen

Ljubljana, 2014

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

# KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK.....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>V</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. UPPs KOT TARČA ZA RAZVOJ PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN .....	1
1.1.1. Bakterijski polisaharidi .....	1
1.1.2. Vloga undekaprenil fosfata in undekaprenil pirofosfatne sintaze .....	3
1.1.3. Kristalna struktura UPPs .....	4
1.1.4. Znane protibakterijske učinkovine .....	6
1.2. RAČUNALNIŠKE METODE .....	8
1.2.1. Filtriranje in priprava knjižnice .....	9
1.2.2. Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda .....	9
1.2.3. Virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče – sidranje .....	12
<b>2. NAČRT ZA DELO .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>17</b>
<b>4. POTEK DELA .....</b>	<b>18</b>
4.1. VIRTUALNO REŠETANJE NA OSNOVI STRUKTURE LIGANDA .....	18
4.2. PRVA SIMULACIJA MOLEKULSKE DINAMIKE .....	19
4.3. PRIPRAVA KONFORMACIJ V RAZLIČNIH ČASOVNIH TRENUTKIH .....	21
4.4. SIDRANJE V KRISTALNO STRUKTURU .....	21
4.5. SIDRANJE V KONFORMACIJE V RAZLIČNIH ČASOVNIH TRENUTKIH .....	23
4.6. OCENA VEZAVNE ENERGIJE S POMOČJO MOLEKULSKE DINAMIKE .....	24
4.7. <i>In vitro</i> TESTIRANJE .....	26
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>27</b>
5.1. NAJBOLJŠE OCENJENE SPOJINE .....	27
5.2. PRIMERJAVA STRUKTUR .....	28
5.3. OCENA VEZAVNE ENERGIJE Z MOLEKULSKO DINAMIKO .....	30
5.4. PRIMERJAVA VEZAVNIH MEST .....	31
5.5. <i>In vitro</i> TESTIRANJE .....	36
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>37</b>
<b>PRILOGA .....</b>	<b>38</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>43</b>

# KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shema prvih stopenj sinteze peptidoglikana .....	3
<b>Slika 2:</b> Kristalna struktura UPPs s FPP .....	4
<b>Slika 3:</b> Vezavno mesto FPP .....	6
<b>Slika 4:</b> Spojine, ki po raziskavah kažejo določeno zaviralo aktivnost proti UPPs .....	7
<b>Slika 5:</b> Prikaz delovanja programa ROCS .....	11
<b>Slika 6:</b> Spojina, ki smo jo uporabili kot predlogo za virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda s programom ROCS .....	18
<b>Slika 7:</b> Encim UPPs, obdan z vodnimi molekulami in proti-ioni, pripravljen za računanje molekulske dinamike .....	20
<b>Slika 8:</b> Vezavno območje v aktivnem mestu kristalne strukture encima UPPs .....	22

---

<b>Slika 9:</b> Primer uporabe orodja <i>obprop</i> programa OpenBabel .....	26
<b>Slika 10:</b> Spojina <u>1</u> v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (200) skupaj z znanim inhibitorjem TH9.....	33
<b>Slika 11:</b> Spojina <u>2</u> v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (680) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 .....	33
<b>Slika 12:</b> Spojina <u>3</u> v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (1400) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 .....	34
<b>Slika 13:</b> Spojina <u>4</u> v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (2100) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 .....	34
<b>Slika 14:</b> Spojina <u>5</u> v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (2199) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 .....	35
<b>Slika 15:</b> Spojina <u>6</u> v vezavnem mestu kristalne strukture encima UPPs skupaj z znanim inhibitorjem TH9 .....	35
<b>Slika 16:</b> Graf RMSD v odvisnosti od časovnih korakov pri simulaciji molekulske dinamike.....	38

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica I:</b> Podatki o velikosti notranje in zunanje površine za pet različnih konformacij encima UPPs v različnih časovnih trenutkih .....	23
<b>Preglednica II:</b> Seznam najboljše ocenjenih spojin po sidranju .....	27
<b>Preglednica III:</b> Ocene s cenalno funkcijo Chemgauss3 .....	30
<b>Preglednica IV:</b> Ocene vezavnih energij z molekulsko dinamiko.....	30
<b>Preglednica V:</b> Seznam spojin, ki smo jih poleg spojin <u>3</u> in <u>4</u> poslali na testiranje v Francijo.....	38

## POVZETEK

Undekaprenil pirofosfatna sintaza (UPPs) je encim, ki v bakterijski celici sodeluje v procesu izgradnje komponent celične stene. UPPs katalizira nastanek *cis*-dvojne vezi v seriji zaporednih kondenzacij farnezilpirofosfata (FPP) z osmimi molekulami izopentenilpirofosfata (IPP). Rezultat te reakcije je undekaprenilpirofosfat ( $C_{55}$ -PP), ki je prekurzor undekaprenilfosfata ( $C_{55}$ -P).  $C_{55}$ -P nastopa kot maščobni membranski prenašalec, na katerega se vežejo hidrofilni prekurzorji tipa saharid-nukleotid. Te  $C_{55}$ -P prenese po hidrofobni notranji membrani do mesta za polimerizacijo, ki je na zunanjem delu membrane. UPPs predstavlja potencialno novo tarčo za razvoj protibakterijskih učinkovin, ker je prisotna samo v bakterijah in ker je njena biološka funkcija zelo pomembna za preživetje bakterij. UPPs je namreč posredno pomembna pri sintezi komponent celične stene, obenem pa je količina  $C_{55}$ -P v bakterijski celici zelo omejena.

Namen diplomske naloge je bil z računalniškimi metodami poiskati nove potencialne zaviralce encima UPPs in njihovo vezavo ovrednotiti s pomočjo molekulske dinamike. V prvem delu naloge smo s programom ROCS izvedli virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda. Tako smo začetno knjižnico, ki je vsebovala več kot 10.000.000 spojin, zmanjšali za približno 100-krat. Sledila je simulacija molekulske dinamike encima UPPs, na podlagi katere smo izbrali pet različnih konformacij encima, dobljenih ob različnih časovnih korakih. V teh pet konformacij in v kristalno strukturo smo nato s programom FRED sidrali našo obogateno knjižnico.

V drugem delu naloge smo vezavno energijo najboljše spojine vsakega izmed šestih sidranja ocenili s simulacijo molekulske dinamike. Primerjali smo rezultate sidranja (ocena s cenilno funkcijo Chemgauss3) in molekulske dinamike in ugotovili, da se razlikujejo. Pri sidranju je bila najboljše ocenjena spojina **2** (sidrana v konformacijo ob 680. koraku) in najslabše spojina **6** (sidrana v kristalno strukturo). Nasprotno, je bila prav spojna **6** najboljše ocenjena pri oceni z molekulsko dinamiko. Pregledali smo simulacijo vezave vseh najboljših šestih spojin v svoja vezavna mesta in ugotovili, da samo spojina **6** kaže enako orientiranost, kot znan zaviralec TH9 in FPP, ter lahko tako tvori vodikove vezi z istimi aminokislinami (Asn28, Gly29, Arg30 in Arg39). Na koncu smo razvrstili spojine iz vseh šestih sidranj in za *in vitro* testiranje izbrali najboljših 24 spojin.

## ABSTRACT

Enzyme undecaprenyl pyrophosphate synthase (UPPs) plays an important role in formation of various bacterial cell wall components. It catalyzes *cis*-double bond formation during sequential condensations of eight isopentenyl pyrophosphate molecules (IPP) with farnesyl pyrophosphate (FPP) to form undecaprenyl pyrophosphate ( $C_{55}$ -PP), which is a precursor for undecaprenyl phosphate ( $C_{55}$ -P).  $C_{55}$ -P is a lipid carrier that transports hydrophilic saccharid-nucleotid particles across the hydrophobic environment of the cytoplasmic membrane to the externally located sites of polymerization. UPPs represents new potential target for development of new antibacterial drugs, due to its absence in humans and its essential role in bacterial viability, and due to the limited quantity of lipid carrier  $C_{55}$ -P in a bacterial cell.

The purpose of the thesis was to find new potential inhibitors of the enzyme UPPs with computational methods and to evaluate their putative binding modes with molecular dynamics. Firstly, we performed ligand based virtual screening with program ROCS and decreased the number of compounds in our screening library for approximately 100x. This was followed by molecular dynamics simulation of enzyme UPPs, on the basis of which we determined five different conformations of UPPs prepared at different snapshots. We used program FRED to dock our screening library into these five conformations and into the crystal structure of UPPs.

In the second part of thesis we evaluated the binding energies of all top six compounds from six dockings with molecular dynamics simulation. These results were compared with the results obtained from docking experiments, where scoring function Chemgauss3 was used. In the evaluation with the scoring function, the best ranked compound was 2 (docked in the conformation at 680th step) and the worst ranked compound was 6 (docked in the crystal structure). In contrast, compound 6 was ranked the best when evaluated by molecular dynamics. Analysis of the binding poses of potential inhibitors revealed that only compound 6 occupies the same position and orientation as the inhibitor TH9 and FPP and is thus probably able to form H-bond with the same amino acids (Asn28, Gly29, Arg30 and Arg39). Finally, 24 top ranked compounds from all six dockings were selected for biochemical evaluation.

## SEZNAM OKRAJŠAV

- Ala – alanin  
Arg – arginin  
Asn – asparagin  
Asp – asparaginska kislina  
 $C_{55}\text{-P}$  – undekaprenilfosfat  
 $C_{55}\text{-PP}$  – undekaprenilpirofosfat (tudi UPP)  
DMAPP – dimetilalilpirofosfat  
FPP – farnezilpirofosfat  
FPPs – farnezil pirofosfatna sintaza  
GlcNAc –  $N$ -acetilglukozamina  
Glu – glutaminska kislina  
Gly – glicin  
GPP – geranilpirofosfat  
His – histidin  
HTS – visoko zmogljivo rešetanje (angl. High Throughput Screening)  
Ile – izolevcin  
IPP – izopentenilpirofosfat  
Leu – levcin  
LPS – lipopolisaharid  
ManNAc –  $N$ -acetilmanozamina  
Met – metionin  
MurNAc –  $N$ -acetilmuraminske kisline  
NMR – jedrska magnetna resonanca (angl. Nuclear Magnetic Resonance)  
PDB – proteinska podatkovna baza (angl. Protein Data Bank)  
Phe – fenilalanin  
RMSD – kvadratni koren povprečja kvadrata standardnih odklonov (angl. Root-mean-square deviation)  
UPPs – undekaprenil pirofosfatna sintaza  
Val – valin

## 1. UVOD

### 1.1. UPPs KOT TARČA ZA RAZVOJ PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN

#### 1.1.1. Bakterijski polisaharidi

Bakterijske polisaharide predstavlja širok spekter makromolekul, med katerimi najdemo peptidoglikan, lipopolisaharide, bakterijske kapsule in eksopolisaharide. Te molekule so komponente celične stene, pomembni faktorji virulence in imajo zaščitne vloge v ekstremnih okoljih (zaščita pred izsuštvijo) (1, 2).

#### PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan je glavna komponenta celične stene in kompleksen polimer, ki omogoča trdno zgradbo bakterijske stene. Osnovni gradnik je iz **N-acetilglukozamina** (GlcNAc) in **N-acetilmuraminske kisline** (MurNAc), ki sta povezana z  $\beta(1, 4)$  vezjo. Osnovni gradniki so med seboj povezani s kratkimi peptidi, ki se vežejo na MurNAc in poskrbijo za prečno premreženost (1, 2).

#### TEIHOJSKE KISLINE

Glavne funkcije teihojskih kislin so:

- obramba pred vstopom škodljivih molekul in okoljskim stresom,
- nadzor encimske aktivnosti in koncentracije kationov v celični ovojnici,
- vezava na receptorje.

Po strukturi so anionski glikopolimeri, ki se prek fosfodiesterske vezi kovalentno vežejo na C6-hidroksi skupino MurNAc v strukturi peptidoglikana. Najdemo jih samo v celični steni Gram pozitivnih bakterij. Osnovna struktura je disaharid, sestavljen iz **GlcNAc** in **N-acetylmanozamina** (ManNAc), ki sta povezana z  $\beta(1, 4)$  vezjo. Na ta disaharid so prek C4-hidroksi skupine ManNAc vezane od ena do tri glicerolfosfatne skupine, ki jim sledi daljša glicerol- ali ribitolfosfatna veriga (3, 4).

#### LIPOPOLISAHARIDI

Lipopolisaharid (LPS) sestavlja zunanji lipidni sloj zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij. Sestavljen je iz lipida A (enote fosforiliranega glukozamina, na katerega so pritrjene dolgoverižne maščobne kisline), polisaharidnega stržena in antigena

O (terminalne polisaharidne molekule, ki predstavljajo najbolj zunanjo domeno LPS). Antigen O je sestavljen iz osnovnih tri-, tetra- ali pentasaharidnih enot. Te se ponovijo do 25-krat. Terminalni deli štrlico iz bakterijske stene in izzovejo močan imunski odgovor. Zato so pomembni kot antigeni Gram negativnih bakterij (1, 5).

### **EKSOPOLISAHARIDI**

So visokomolekularni polisaharidi, ki jih bakterije izločajo v okolico. Večina funkcij, ki jih pripisujejo eksopolisaharidom, je zaščitne narave; sposobnost mikroorganizma, da se obdaja z eksopolisaharidnimi sloji, lahko ponudi zaščito pred izsušitvijo, prisotnost želirane polisaharidne plasti okoli celice ima pomembno vlogo na difuzijske lastnosti, anionski polisaharidi pa lahko vplivajo na prehod koristnih in toksičnih kovinskih ionov skozi membrano (6).

Opisane komponente celične stene druži dejstvo, da njihova biosinteza poteka zelo podobno:

1. biosinteza prekurzorja saharid-nukleotid v citoplazmi;
2. prenos prekurzorja saharid-nukleotid na maščobni prenašalec, ki je na notranji strani membrane;
3. prenos prekurzorja na zunanjo stran membrane in polimerizacija makromolekule (5–7).

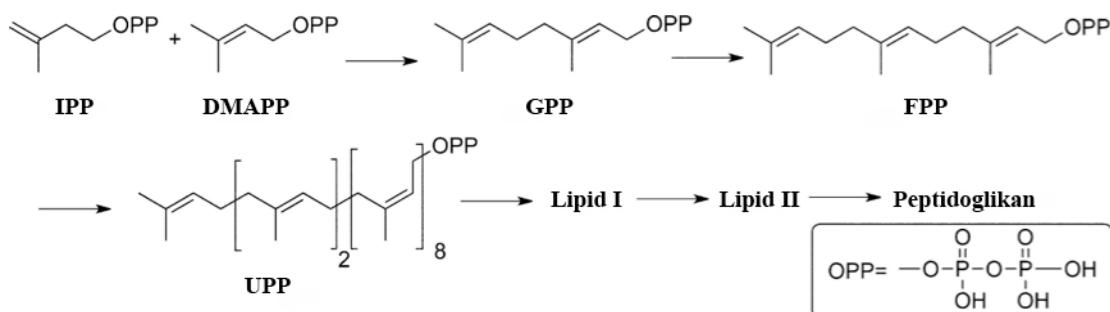
Biosinteza peptidoglikana se začne v citoplazmi s tvorbo UDP-MurNAc-pentapeptida. Ta se nato veže na membranski maščobni prenašalec undekaprenilfosfat ( $C_{55}\text{-P}$ ) in tvori se lipid I. Sledi vezava GlcNAc prek  $\beta(1, 4)$  vezi in nastanek lipida II, ki se potem prenese na zunanjo stran membrane. Tam prek transglukolizacije in transpeptidacije potečeta vezava z delom peptidoglikana, ki že obstaja, in prečna premrežitev peptidnih stranskih verig (8–11).

Pri nastanku teihojskih kislin je začetek enak. Na  $C_{55}\text{-P}$  se veže GlcNAc. Nato se prek  $\beta(1, 4)$  vezi na GlcNAc pripne ManNAc in tvori se disaharid, na katerega se, odvisno od vrste bakterije, postopoma pripenjajo glicerol- ali ribitolfosfatne skupine. Teihoske kisline se prenesejo na zunanjo stran membrane, kjer se pripnejo na peptidoglikan (3, 4). Prek maščobnega nosilca  $C_{55}\text{-P}$  poteka tudi biosinteza O-antigena (sestavni del LPS) in znotrajceličnih eksopolisaharidov.

### 1.1.2. Vloga undekaprenil fosfata in undekaprenil pirofosfatne sintaze

Undekaprenilfosfat ( $C_{55}$ -P) ima pomembno vlogo v prej omenjenih biosinteznih poteh celičnih komponent. V biosintezi teh komponent  $C_{55}$ -P nastopa kot maščobni membranski prenašalec, na katerega se vežejo prekurzorji tipa saharid-nukleotid, ki so zelo hidrofilni.  $C_{55}$ -P prenese hidrofilne monomerne enote po hidrofobni notranji membrani do mesta za polimerizacijo, ki je na zunanjem delu membrane.

V nastanku maščobnega prenašalca sodelujejo dva encima – farnezil pirofosfatna sintaza (FPPs) in **undekaprenil pirofosfatna sintaza** (UPPs). Najprej FPPs katalizira kondenzacijo dimetilalilpirofosfata (DMAPP) z izopentenilpirofosfatom (IPP). Tvorita se geranilpirofosfat (GPP) in nato farnezilpirofosfat (FPP). UPPs v naslednji stopnji katalizira nastanek *cis*-dvojne vezi med serijo zaporednih kondenzacij FPP z osmimi IPP. Nastane undekaprenilpirofosfat ( $C_{55}$ -PP), ki je prekurzor  $C_{55}$ -P (8, 12, 13).



**Slika 1:** Shema prvih stopenj sinteze peptidoglikana (IPP – izopentenilpirofosfat, DMAPP – dimetilalilpirofosfat, GPP – geranilpirofosfat, FPP – farnezilpirofosfat, UPP – undekaprenilpirofosfat)

Preden se  $C_{55}$ -P lahko uporabi kot maščobni membranski prenašalec, je potrebna še defosforilacija  $C_{55}$ -PP. Ta reakcija je nujna tudi po vsakem koraku polimerizacije komponent celične stene. Katalizira jo encim undekaprenil pirofosfatna fosfataza (8).

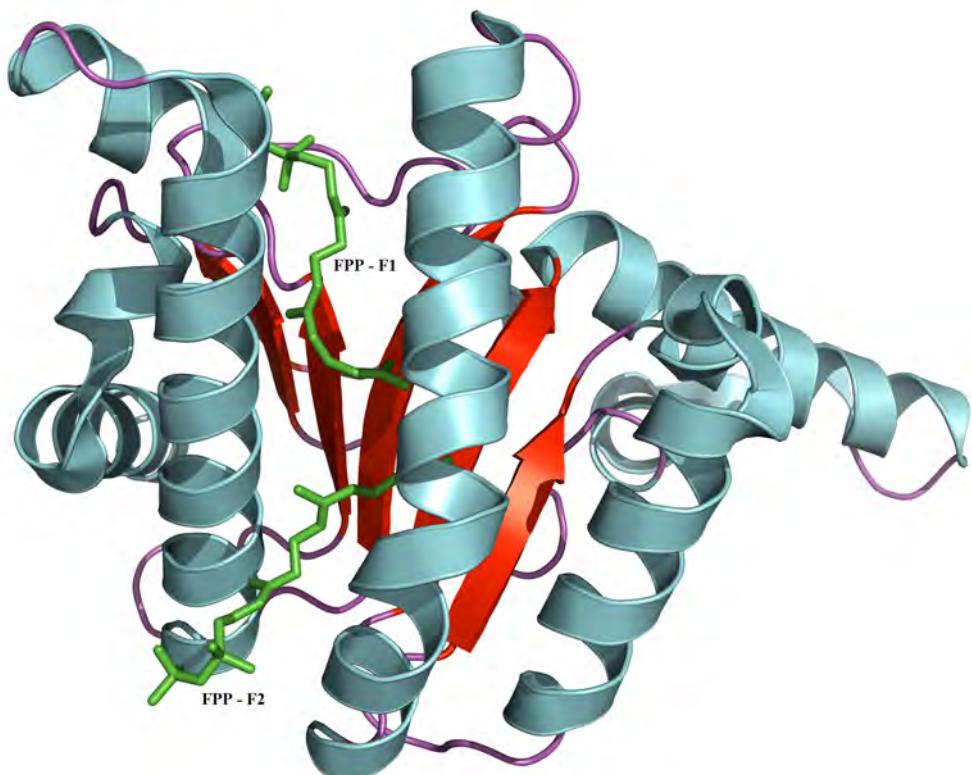
Po eni teoriji naj bi bile količine maščobnega prenašalca  $C_{55}$ -P v bakterijski celici zelo nizke, hkrati pa naj bi imela bakterija omejene možnosti povečanja koncentracije. Po drugi teoriji, pa naj bi blokada nebistvenih od  $C_{55}$ -PP odvisnih poti vodila do nabiranja intermediatov, povezanih s  $C_{55}$ -PP, in tako neposredno poškodovala celico. Če poleg tega upoštevamo, da je biološka funkcija UPPs izredno pomembna, saj je odgovorna za sintezne poti komponent celične stene, da je aktivno mesto UPPs podvrženo inhibiciji s strani manjših molekul, in da UPPs v človeškem organizmu ni prisotna, lahko UPPs

predstavlja zanimivo tarčo za razvoj novih protibakterijskih učinkovin z dosedaj neizkoriščenim mehanizmom delovanja (3, 12, 13).

### 1.1.3. Kristalna struktura UPPs

UPPs je topen citoplazemski encim, ki generira nastanek produkta ( $C_{55}$ -PP), vgrajenega v membrano. Spada v skupino *cis*-preniltransferaz. Odkrili so, da se *cis*-preniltransferaze pomembno razlikujejo od *trans*-preniltransferaz. Še posebej je velika razlika v tem, da nimajo z aspartatom bogatega dela DDXD, ki je bistven pri vezavi substrata prek  $Mg^{2+}$  mostu pri *trans*-preniltransferazah.

Kristalna struktura UPPs je znana in se tako kot primarna struktura popolnoma razlikuje od zgradbe *trans*-preniltransferaz. Encim je homodimer, vsaka podenota ima velikost 29 kDa. Vsak monomer je sestavljen iz šestih vzporednih  $\beta$ -ravnin, ki so obdane s petimi do sedmimi  $\alpha$ -vijačnicami. Vse vijačnice so ravne, razen  $\alpha_3$ , ki je prepognjena. Na površju proteina je hidrofobna votlina, globoka 30 Å, ki ima ob vhodu nekaj pozitivno nabitih delov in strukturno P-zanko, značilno za encime, ki vežejo fosfate.



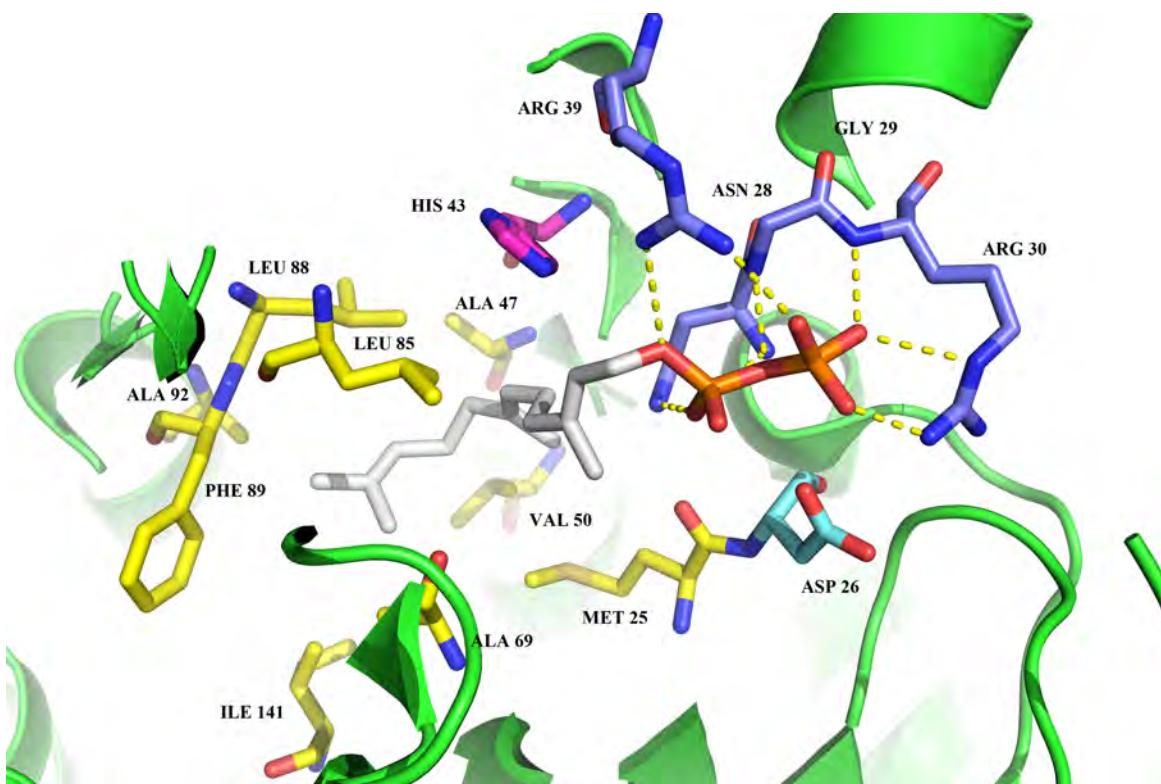
**Slika 2:** Kristalna struktura UPPs (z modro so obarvane  $\alpha$ -vijačnice in z rdečo  $\beta$ -ravnine) s FPP (zelena barva); FPP-F1 se veže na vrhu votline, FPP-F2 pa na dnu

Encim obstaja v dveh konformacijah, odprtih in zaprtih. Obe sta prisotni pri obeh monomerih.  $\alpha$ 3-vijačnica je pri zaprti konformaciji bolj prepognjena kot pri odprtih. Na monomer A se vežeta dve molekuli FPP – ena na vrhu (slika 2 – FPP-F1) in druga na dnu votline (slika 2 – FPP-F2), medtem ko se na monomer B veže samo ena FPP, in sicer na dnu votline. Ugotovili so, da je aktivno mesto tam, kjer se veže molekula FPP, ki je na vrhu votline. V zaprti konformaciji, ki je edina katalitično aktivna, se  $\alpha$ 3-vijačnica premakne bližje vijačnici- $\alpha$ 2, aktivno mesto postane ožje in tako pride do boljših interakcij med ligandom in UPPs.

Na podlagi računanja elektronske gostote so ugotovili, da imata obe molekuli FPP vezani na monomer A dvojno vez v *trans* položaju. FPP-F1 se veže v žep aktivnega mesta, tako da sta v bližini pirofosfatnega dela aminokislinski Arg30 in Arg39, blizu C2 atoma je His43 (slika 3 – roza barva), hidrofobni aminokislinski ostanki Leu85, Leu88, Phe89 in Val50 pa obdajajo ogljikovodikov del molekule. Podrobnejši vpogled v aktivno mesto razkrije, da se med kisikovimi anioni pirofosfatnega dela in NH skupinami v glavnih verigah aminokislín Gly29 in Arg30 tvorijo vodikove vezi (slika 3 – temno modra barva). Vodikove vezi se tvorijo tudi z NH skupinami v stranskih verigah aminokislín Asn28, Arg30 in Arg39 (slika 3 – temno modra barva).

Ugotovili so, da je Asp26 (slika 3 – svetlo modra barva) v bližini FPP odgovoren za katalitično aktivnost UPPs, ne pa za vezavo FPP, kot so sprva domnevali. Asp26 ima najverjetneje vlogo baze, ki pripravi IPP za nukleofilni napad na FPP, tako da mu odcepi proton. Asp26 se nahaja točno v aktivnem mestu za FPP. Z vodikovimi vezmi je vezan na druge aminokisline, kot sta Gly27 in Arg194, njegova karboksilna skupina pa kaže v smeri vezavnega mesta IPP. K vezavi IPP naj bi pripomogli tudi aminokislini Glu198 in Arg200, ki sta povezani z vodikovo vezjo in sta v bližini vezavnega mesta.

Interakcije med repom ogljikovodikov molekule FPP in aktivnim mestom UPPs so večinoma hidrofobne. V teh interakcijah so udeležene stranske verige aminokislín Met25, Ala47, Val50, Ala69, Leu85, Leu88, Phe89, Ala92 in Ile141 (slika 3 – rumena barva). Tri izmed teh aminokislín, Leu85, Leu88 in Phe89, so na  $\alpha$ 3-vijačnici, ki se zavrti ob spremembji konformacije. Ta vijačnica je ključni dejavnik pri regulirjanju aktivnosti. Ko tvori zaprto aktivno obliko, se približa vijačnici- $\alpha$ 2. V tej aktivni obliki so aminokisline Leu85, Leu88 in Phe89 bližje vezanemu FPP. Nasprotno so v odprtih oblikih bolj oddaljene in zato ima odprta konformacija manjšo aktivnost. To kaže na to, da imajo Leu85, Leu88 in Phe89 neposredno vlogo pri katalitični aktivnosti encima (8, 12, 14).



**Slika 3:** Vezavno mesto FPP (z aminokislinami, označenimi z rumeno barvo, FPP tvori hidrofobne interakcije, medtem ko s temno modrimi tvori vodikove; s svetlo modro je označena aminokislina Asp26, ki poskrbi za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina His43, ki se nahaja blizu C2 atoma)

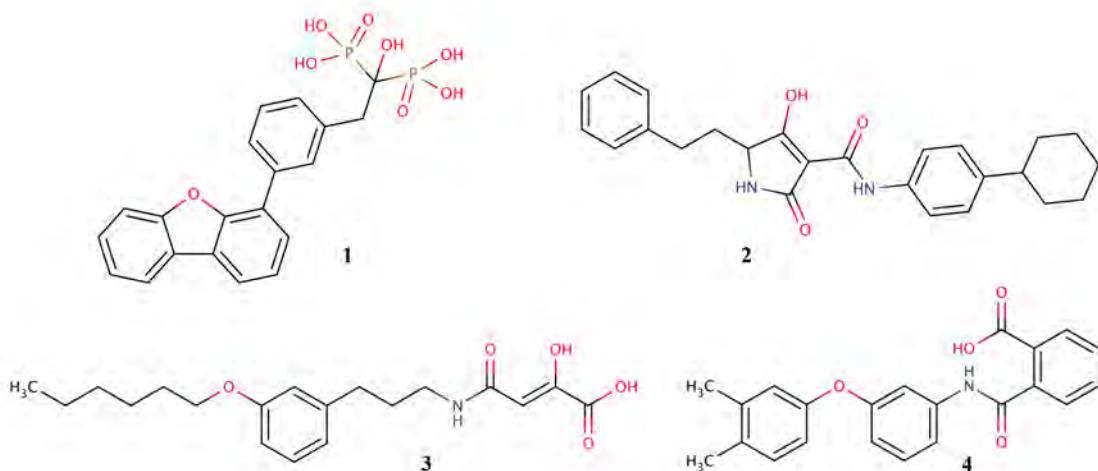
Na podlagi analize vezave FPP na UPPs so postavili hipotezo o vezavi. Predlagali so, da naj farmakofor sestavlja dva akceptorja H-vezi in ena hidrofobna skupina. Ligand naj bi vseboval tudi ciklično karbonilno skupino, ki naj bi skupaj z aciklično amidno NH skupino prek vodikovih vezi stabilizirala njegovo konformacijo (12).

#### 1.1.4. Znane protibakterijske učinkovine

Zaradi prej omenjenih lastnosti UPPs in hkrati zaradi vedno večje rezistence proti antibiotikom predstavlja UPPs zanimivo tarčo, prek katere bi lahko odkrili nove zdravilne učinkovine. Trenutno učinkovin s takim delovanjem na trgu še ni.

Raziskovalci pa so odkrili že kar nekaj potencialno zanimivih spojin, ki bi lahko, z nekaj optimizacije, predstavljale spojine vodnice. Ugotovili so, da zaviralno aktivnost do UPPs kažejo:

- derivati bifosfonatov (slika 4-1),
- derivati tetramskih in tetrokskih kislin ter derivati dihidropiridin-2ona (slika 4-2),
- derivati keto in diketo kislin (slika 4-3),
- derivati benzojske kisline (slika 4-4) (15).



**Slika 4:** Spojine, ki po raziskavah kažejo določeno zaviralno aktivnost proti UPPs (1 – derivat bifosfonata, 2 – derivat tetraminske kisline, 3 – derivat keto kisline, 4 – derivat benzojske kisline)

Če pogledamo celotno biosintežno pot peptidoglikana in drugih komponent celične stene, lahko ugotovimo, da je znanih že nekaj zdravilnih učinkovin. Njihovo delovanje sicer ni neposredno povezano z UPPs, je pa povezano s produkti in substrati, ki sodelujejo v reakcijah za ali pred UPPs.

Napad na pirofosfatni del C<sub>55</sub>-PP, produkta UPPs, naj bi bil del mehanizma delovanja nizina, lanitibiotika, katerega glavna tarča je lipid II. Reakcija defosforilacije C<sub>55</sub>-PP bi lahko bila tarča delovanja kolicina M, bakteriostatičnega toksina, ki ga za obrambo izdelujejo nekateri sevi *E. coli*. Kolin M katalizira razgradnjo lipida I in lipida II.

Bacitracin je antibiotik, ki zavira biosintezo celične stene. Pospešuje razpad C<sub>55</sub>-PP in tako izzove izgubo celične integritete in lizo celice. Ta močan antibiotik, proizveden kot zmes povezanih cikličnih polipeptidov iz nekaterih sevov *Bacillus licheniformis* in *B. subtilis*, se široko uporablja za preprečevanje in zdravljenje okužb živali, vzgojenih za prehrano. Klinično ga v kombinaciji z drugimi protibakterijskimi zdravili uporabljam za zdravljenje okužb površinskih ran, medtem ko se peroralno uporablja pri okužbah z enterokoki, odpornimi na vankomicin (8).

## 1.2. RAČUNALNIŠKE METODE

Farmacevtska industrija se v zadnjem času vedno bolj ukvarja z vprašanjem, kako skrajšati čas od odkritja nove učinkovine do kliničnih študij in tako pacientom zagotoviti čimprejšnjo možnost zdravljenja. Če k temu prištejemo še pritisk javnosti po zniževanju cen zdravil, je jasno, da vneto išče nove tehnologije, ki bi zagotavljale lažjo in bolj ekonomično pot do novih potencialnih zdravilnih učinkovin. Virtualno rešetanje je zagotovo ena izmed takšnih tehnologij, ki v zadnjem času dobiva vedno večji pomen (16).

Trenutno v farmacevtski industriji za odkrivanje novih spojin večinoma uporabljajo metodo visoko zmogljivega rešetanja (High Throughput Screening – HTS). Gre za metodo, pri kateri robot z biokemijskimi metodami preveri aktivnosti tudi več 10.000 spojin na določeni tarči na dan. HTS so začeli intenzivneje uporabljati v poznih osemdesetih in devetdesetih letih prejšnjega stoletja z namenom, da bi prevzel vodilno vlogo v odkrivanju novih spojin zadetkov, vendar so kmalu ugotovili, da gre za drago in časovno potratno metodo. Tudi rezultati niso bili v skladu s pričakovanji. Pogosto odkritih novih spojin ni bilo mogoče optimizirati do spojine vodnice ali do zdravilne učinkovine. Vedno večja ovira je tudi povečanje stroškov, saj je treba zgraditi in vzdrževati knjižnico z več milijoni spojin ter reagenti za analize, velik strošek pa je tudi celotna robotska tehnologija (16).

Tako je v iskanju novih spojin virtualno rešetanje pridobivalo vedno večjo veljavo. V širšem pomenu je virtualno rešetanje »iskanje novih biološko aktivnih spojin iz obsežnih knjižnic spojin z uporabo računalniških metod.« Metoda temelji na uporabi algoritmov, s katerimi poskušamo ugotoviti vezavno energijo molekul v določenem aktivnem mestu tarče. Vedno bolj zmogljivi računalniški procesorji, vedno boljša programska oprema in napredek pri ugotavljanju 3D-strukture proteinskih tarč pa so poskrbeli, da virtualno rešetanje dobro dopolnjuje HTS in mu vedno bolj tudi konkurira (17).

Virtualno rešetanje omogoča pripravo boljših knjižnic spojin, saj izločimo spojine, ki skoraj gotovo niso aktivne. Rezultat je obogatena knjižnica spojin, skrčena z več milijonov spojin na nekaj tisoč, ki jo lahko testiramo v laboratoriju. Hkrati omogoča rešetanje ne samo virtualnih knjižnic, ki jih ima v lasti neko podjetje, temveč tudi vseh drugih knjižnic virtualnih spojin, ki so na voljo. Uporabna lastnost virtualnega rešetanja je tudi ta, da lahko simuliramo biološko delovanje virtualne spojine, ki še ne obstaja. Če je vrednotenje s cenilnimi funkcijami ugodno, se lahko pozneje odločimo za njeno sintezo.

### 1.2.1. Filtriranje in priprava knjižnice

Pri virtualnem rešetanju je zelo pomembna dobra in ustrezna priprava virtualne knjižnice spojin. Danes je na internetu na voljo kar nekaj knjižnic (ZINC, PubChem, National Cancer Institute itn.), do katerih lahko dostopamo brezplačno. Knjižnice vsebujejo več milijonov spojin in vse te zagotovo niso aktivne na iskano tarčo. Pogosto se zgodi, da veliko spojin zadetkov sicer kaže dobro aktivnost proti aktivnemu mestu, vendar so neuporabne zaradi slabših farmakokinetičnih in toksičnih lastnosti ali pa pozneje spojine ne prestanejo kliničnega preizkušanja. Zato je treba knjižnice pred virtualnim rešetanjem zmanjšati z uporabo ustreznih filtrov, s katerimi dobimo knjižnico spojin, ki imajo ustrezne in učinkovini podobne fizikalno-kemijske lastnosti (18).

Tako dobimo učinkovini podobne spojine oziroma »drug-like« spojine. Kriterije za iskanje učinkovini podobnih spojin je določil Christopher A. Lipinski, tako da je analiziral fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin, ki so bile takrat na trgu. Poimenoval jih je »pravilo petic«. To pravilo govori o tem, da naj bi spojine, primerne kot zdravilne učinkovine, imele te lastnosti:

1. molekulska masa je manj kot 500 g/mol,
2. logP je manj kot 5,
3. število donorjev H-vezi je manj kot 5,
4. število akceptorjev H-vezi je manj kot 10.

Z upoštevanjem teh pravil se že v začetni fazi priprave knjižnice znebimo spojin, za katere predvidevamo, da imajo slabše ADME (absorpcija, distribucija, metabolizem, eliminacija) lastnosti (19).

Z upoštevanjem teh pravil pri pripravi knjižnice za virtualno rešetanje si zelo olajšamo naslednje korake v iskanju novih spojin, saj se s filtriranjem lahko hitro in učinkovito znebimo spojin z neugodnimi lastnostmi.

### 1.2.2. Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda

Pri virtualnem rešetanju poznamo dva različna pristopa. Prvi je rešetanje na osnovi strukture liganda, pri katerem ne potrebujemo znane strukture tarče. Potrebna je spojina z znano strukturo in določeno aktivnostjo do aktivnega mesta tarče. Ob predpostavki, da imajo spojine s podobno strukturo podobno aktivnost, to izhodno spojino uporabimo kot model pri iskanju novih spojin (17).

Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda lahko razdelimo na tri glavne razrede:

### a) Rešetanje na osnovi podobnosti

Ta princip govori o tem, da bodo struktурno podobne spojine verjetno imele podobne lastnosti. Pomembna sta dva dejavnika – molekulski deskriptorji in koeficient podobnosti, ki se izračuna na podlagi teh deskriptorjev. Molekulski deskriptor je vsaka eksperimentalno ugotovljena ali izračunana številčna vrednost, ki je povezana s strukturo molekule. Je končni rezultat logičnega in matematičnega postopka, ki pretvori kemično informacijo, zapisano v molekulski formuli, v uporabno številčno vrednost. Večina računalniških programov računa podobnost med molekulami na podlagi 2D-prstnih odtisov (angl. fingerprint). Princip je zelo preprost – program preverja, ali so določene lastnosti prisotne oziroma odsotne pri molekuli in nato za vsako molekulo posebej poda vrednost v binarnem zapisu, v katerem bit predstavlja prisotnost (1) ali odsotnost (0) določene lastnosti. Binarne zapise nato med seboj primerja in molekulsko podobnost poda v obliki koeficiente. Najpogosteje uporabljen je **Tanimotov koeficient** (enčba I) (20).

$$T_{AB} = \frac{c}{a+b-c} \quad [1]$$

$T_{AB}$  ... podobnost med molekulama,

a ... število bitov prve molekule,

b ... število bitov druge molekule,

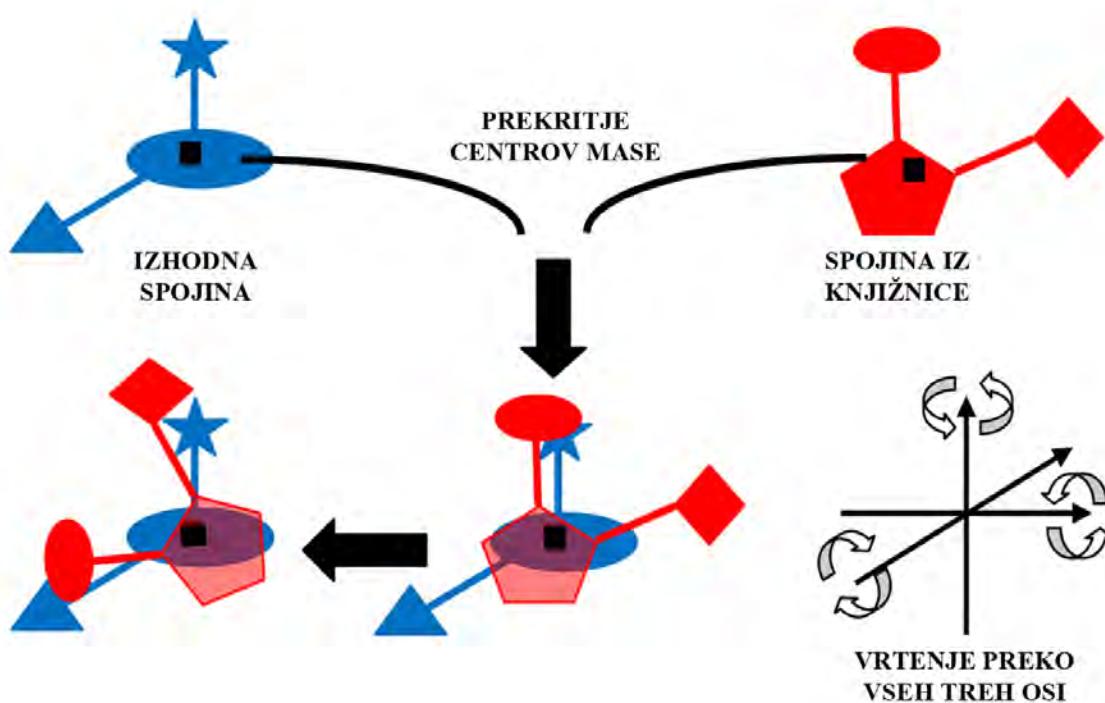
c ... število skupnih bitov obeh molekul.

Vrednost  $T_{AB}$  je med 0 in 1, pri čemer vrednost 0 predstavlja maksimalno različnost, 1 pa maksimalno podobnost med molekulama. Pomembno je opozoriti, da vrednost 1 ne pomeni nujno, da sta molekuli identični. Molekuli lahko vsebujejo enake funkcionalne spojine, vendar na različnih mestih. Po nekaterih raziskavah naj bi Tanimotov koeficient višji od 0,85, z visoko verjetnostjo kazal na enako bioaktivnost med primerjanimi spojinami (21, 22).

### **ROCS**

ROCS je program, ki uporablja 3D-deskriptor – obliko in volumen molekule ter njeni ureditev v prostoru. Program primerja oblike med molekulami po principu, da imata

molekuli podobno obliko, če se dobro prekrivata njuna volumna. Deluje tako, da prekrije centra mas obeh molekul in ju zarotira prek vseh treh koordinatnih osi z namenom, da dobi najboljše prekrivanje. Program najprej primerja podobnost v prekrivanju volumna in rezultat poda kot *Shape Tanimoto*. Vrednosti so lahko med 0 in 1, pri čemer 1 pomeni popolno prekrivanje, 0 pa, da se molekuli ne prekrivata. Hkrati pa ROCS primerja tudi položaj funkcionalnih skupin – donorjev in akceptorjev H-vezi, anionskih in kationskih funkcionalnih skupin, hidrofobnih funkcionalnih skupin in obročev. Tudi to prekrivanje, *Colour Tanimoto*, oceni z vrednostjo med 0 in 1. Program poda rezultat kot seštevek obeh vrednosti, kjer je vrednost med 0 in 2 – *Tanimoto Combo* (23).



Slika 5: Prikaz delovanja programa ROCS

### b) Rešetanje na osnovi farmakofora

Farmakofor je 3D-ureditev molekulskih značilnosti, lastnosti in fragmentov, ki so nujen, vendar ne zadosten pogoj za biološko aktivnost. Metoda vključuje identifikacijo farmakoforskega vzorca, skupnega skupini znanih aktivnih spojin, in nato uporabo tega vzorca v iskanju 3D-podstrukture. Kot rezultat lahko dobimo popolnoma različne spojine, ki bodo imele podobno prostorsko ureditev farmakoforjev (17, 24).

### c) Rešetanje na osnovi računalniško podprtega učenja

Pravilo razvrstitev je odvisno od programa, ki predvideva strukturne zahteve na podlagi znanih aktivnih in neaktivnih spojin (17).

#### **1.2.3. Virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče – sidranje**

Drugi pristop virtualnega rešetanja je rešetanje na osnovi strukture tarče oziroma sidranje (angl. docking). Pri tem postopku moramo nujno poznati 3D-strukturo tarčnega proteina, ki jo navadno pridobijo z rentgensko kristalografijo, NMR-spektroskopijo ali homolognim modeliranjem. Zaradi hitrega razvoja strukturne biologije se povečuje število dostopnih 3D-struktur proteinov in je zato ta princip virtualnega rešetanja vedno bolj v uporabi (17, 25).

Proces sidranja lahko razdelimo na dva dela. Začne se s postopkom umeščanja liganda v aktivno mesto proteina, kjer program preveri, ali se položaj, konformacija in orientacija liganda prilegajo aktivnemu mestu tarče (angl. posing). Zaradi različnih konformacij liganda je to zahteven postopek, ki lahko da številne različne rezultate. Nato s cenilno funkcijo ocenimo biološko aktivnost liganda (angl. scoring) oziroma vrednotimo jakost interakcij med ligandom in biološko tarčo.

Največje težave pri rešetanju na osnovi strukture tarče predstavlja upoštevanje fleksibilnosti tarče in liganda ter vpliva vodnih molekul v neposredni bližini aktivnega mesta (26). Vrednotenje fleksibilnosti liganda in tarče je računsko zelo zahteven in časovno potraten postopek. Zato večina računalniških programov upošteva samo fleksibilnost liganda.

#### **METODE VIRTUALNEGA REŠETANJA NA OSNOVI STRUKTURE TARČE**

Program FRED, ki smo ga uporabili pri računanju, umešča ligande s **sistematičnimi metodami**. Te metode vzorčijo vse možne stopnje prostosti liganda z neko določeno ločljivostjo in zato lahko pride do kombinatorične eksplozije konformerov. Da se izognemo časovno potratni obdelavi podatkov, do katere pride v tem primeru, programi uporablja razne algoritme. Tako se že na začetku izločijo nesmiselne konformacije in se v računanju ne upoštevajo. Ena izmed možnosti je, da program v aktivno mesto ločeno umesti fragmente liganda, nato pa sestavi najboljšo konformacijo. Drugi programi ligande razdelijo v rigidni centralni fragment in fleksibilne stranske verige. Najprej sidrajo rigidni,

nato pa fleksibilni del. Tretja možnost je, da programi uporabljajo knjižnice spojin z že vnaprej ustvarjenimi konformacijami in nato sidrajo vsak konformer rigidno. Poleg sistematičnih metod obstajata še dve različni metodi za umeščanje ligandov.

**Naključne metode** se v praksi uporabljajo zelo pogosto. Najbolj znana algoritma, ki se uporablja pri naključnih metodah, sta Monte Carlo in genetski algoritem. Oba izvajata naključne spremembe na ligandu ali populaciji ligandov z namenom dobiti najboljši rezultat. Pri algoritmu Monte Carlo naključno umestimo ligand v aktivno mesto, kjer se nato upoštevajo naključne konformacije, translacije in rotacije. Vezavo liganda po vsaki naključni spremembi ocenimo s cenilno funkcijo. Pri odločitvi, ali se nova konfiguracija obdrži ali ne, uporabljam kriterij Metropolis, ki pravi, da takoj sprejmemo vsako novo konfiguracijo, ki jo ocenimo boljše kot prejšnjo. Če jo ocenimo slabše, jo sprejmemo na podlagi ocene Boltzmannove verjetnostne funkcije. Genetski algoritmi so prilagojeni naravni selekciji. Parametri liganda so kodirani v kromosому in se stohastično spreminjajo. Z mutacijami in zamenjavami se tvorijo nove konformacije liganda, ki jih cenilna funkcija oceni in ohrani najboljše.

Tretje, **simulacijske metode** veljajo za najbolj natančne, a po drugi strani tudi za najbolj časovno potratne. Zato jih redko uporabljam. Najbolj popularna pristopa sta molekulska dinamika in minimizacija energije. Molekulska dinamika temelji na Newtonovi enačbi gibanja za sistem atomov, kjer sta za določitev položaja atoma pomembna parametra atomska masa in naboj. Najprej je treba pripraviti računalniški prostorski model atomov sistema ligand-receptor. Nato ocenimo sile, ki delujejo na vsak atom v sistemu. Program nato na podlagi Newtonovega zakona o gibanju premakne atome in spremeni njihov položaj. Premik traja 1–2 fs. Postopek večkrat ponovimo (25, 27).

## **CENILNA FUNKCIJA**

Drugi del sidranja, ki sledi umeščanju liganda v aktivno mesto proteina, je ovrednotenje in razvrstitev predlaganih konformacij liganda. To je nujno za dobro virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče. Tudi, če konformacije predvideno pravilno umestimo v aktivno mesto tarče, vrednotenje ne bo uspešno, če program ne bo zaznal razlike med ustrezнимi in neustreznimi konfiguracijami oziroma če »dobre« ligande ne bomo identificirali (25).

Program FRED uporablja cenilni funkciji (Chemgauss3 in Chemgauss4), ki z uporabo Gaussovega zglajenega potenciala ocenita komplementarnost liganda z aktivnim mestom. Interakcijski potenciali v Chemgaussovi cenilni funkciji, ki opisujejo interakcije med

dvema paroma atomov v odvisnosti od medsebojne razdalje, na začetku opišemo kot stopničaste funkcije. Interakcije nato prenesemo na mrežo in ovijemo s sferično Gaussovo funkcijo, ki zgladi potencial in ga tako naredi manj občutljivega na manjše spremembe položaja liganda. Glajenje potenciala ima dva namena:

- sidranje lahko izvedemo pri manjši ločljivosti, saj manjše spremembe v položaju ne povzročijo večjih sprememb v oceni;
- zmanjšamo napako, ki je povezana z aproksimacijo rigidnega proteina.

Cenilna funkcija **Chemgauss3** prepozna in ovrednoti te tipe interakcij:

#### **a) Komplementarnost oblike liganda oblik aktivnega mesta**

Pri računanju komplementarnosti na podlagi oblike so pomembni samo težki atomi. Vsak tak atom v ligandu ocenimo na podlagi razdalje med njim in težkim atomom v proteinu. Če je razdalja med njima manjša kot vsota polmerov dosegov Van der Waalsove sile, težkemu atomu liganda dodelimo negativno oceno. V nasprotnem dodelimo rezultat, ki je sorazmeren številu težkih atomov proteina med 1,25- in 2,5-kratnikom vsote polmerov dosegov Van der Waalsove sile.

#### **b) Vodikove vezi med ligandom in proteinom**

Usmerjenost potencialnih vodikovih vezi določata položaj vodika ali valenčnih elektronskih parov. Vodikova vez med ligandom in proteinom zaznamo in ocenimo z rezultatom, ko je vodik liganda oddaljen od komplementarnega valenčnega elektronskega para manj kot 1 Å. Če ima ligand možnost vzpostaviti več vodikovih vezi, je končni rezultat seštevek vsake posamezne vezi.

#### **c) Vodikove vezi med ligandom in topilom**

Vodikove vezi med ligandom in topilom, ki se prekinejo, ko se ligand sidra v aktivno mesto, ocenimo z negativnim rezultatom. Število prekinjenih vodikovih vezi s topilom ugotovimo na podlagi števila vodikovih vezi vode, ki jih ta lahko tvori s proteinom, ko ligand sidramo. Dodelimo negativni rezultat, ki je sorazmeren s številom vodikovih vezi.

#### **d) Interakcije med kovinskimi ioni in kelatorji**

Upoštevamo samo interakcije med kovinskimi ioni v proteinu in kelatorskimi skupinami liganda (in ne obratno). Za vsako kelatorsko skupino liganda izračunamo položaj, od

katerega mora biti kovinski ion proteina oddaljen največ 1 Å. Če je kovinski ion proteina oddaljen več kot 1 Å, dodelimo oceno 0.

### **FRED**

Pri našem delu smo uporabili program FRED družbe OpenEye. FRED je hiter in učinkovit program za sidranje, njegova zmogljivost je bistveno bolj zanesljiva (nižja varianca) v primerjavi z drugimi programi. FRED sidra molekule različnih konformacij, pridobljenih iz podatkovne knjižnice, ki jo je treba predhodno pripraviti, na receptorsko vezavno mesto z uporabo sistematičnih metod. S tem izčrpno in nenaključno preveri vse mogoče konformacije liganda, vezanega na receptor. Nato sledita optimizacija najboljše ocenjenih konformacij in ovrednotenje s končno oceno. V nadaljevanju je delovanje programa FRED predstavljeno podrobnejše:

1. FRED najprej označi vsako možno rotacijo in translacijo vsake konformacije liganda, ki je sidran v aktivno mesto;
2. zavrže oblike liganda, ki se v aktivno mesto ne vežejo oziroma so od njega preveč oddaljene;
3. zavrže vse konformacije liganda, ki nimajo vsaj enega težkega atoma znotraj določene notranje površine, če je ta določena;
4. zavrže vse konformacije, ki ne ustrezano omejitvam, ki jih uporabnik določi vnaprej;
5. preostale konformacije oceni z uporabo cenalne funkcije Chemgauss3;
6. ovrednoti in razvrsti konformacije in najboljše predava v optimizacijo.

Optimizacija:

1. označi/oštevilči bližnje položaje za vsako postavitev, pri čemer iz začetne postavitve izhaja en pozitivni oziroma en negativni korak za vsako translacijsko oziroma rotacijsko prostostno stopnjo (skupno 729 položajev);
2. vsako konformacijo oceni s cenalno funkcijo Chemgauss3;
3. obdrži konformacije liganda z najvišjimi ocenami vezave;
4. skupna povprečna ocena liganda, ki se uporabi za razvrščanje molekule glede na druge v ustreznih podatkovnih bazah, se uporabi kot najvišja ocena najboljše postavitev (28).

## 2. NAČRT ZA DELO

Z računalniškimi metodami bomo iskali nove zaviralce encima UPPs iz bakterije *Escherichia coli* in njihovo vezavo vrednotili s pomočjo molekulske dinamike. Iz proteinske podatkovne baze (Protein Data Bank – PDB) bomo pridobili kristalno strukturo encima UPPs z vezanim zaviralcem z znano strukturo. Ta zaviralec nam bo služil kot osnova za virtualno rešetanje na osnovi liganda, s katerim bomo rešetali komercialno dostopno knjižnico spojin ZINC. Obdržali bomo 100 tisoč najboljših spojin in jih uporabili v naslednjih stopnjah. S pomočjo molekulske dinamike v vodi bomo raziskali konformacijski prostor aktivnega mesta UPPs. Različne konformacije iz molekulske dinamike in tudi izhodno kristalno strukturo bomo nato uporabili za virtualno rešetanje na osnovi strukture tarče (sidranje). V vsako od struktur encima bomo sidrali 100 tisoč spojin iz virtualnega rešetanja na osnovi strukture liganda. Najboljše ocenjene spojine iz vsakega sidranja bomo nato dodatno vrednotili s pomočjo molekulske dinamike, s katero bomo izračunali vezavne energije in tako ugotovili, katero rešetanje je dalo najboljši rezultat.

### 3. MATERIALI IN METODE

Pri virtualnem rešetanju na osnovi strukture liganda in strukture tarče smo uporabili dva računalnika:

- **računalnik 1 (»lasser«):**

procesor: 4 x 8 core 2.0 GHz AMD Opteron 6128,  
pomnilnik: 32 GB RAM,  
trdi disk: 2 x 1 TB disk,  
operacijski sistem: Scientific Linux 6.2;

- **računalnik 2 (»gangsta«):**

procesor: 4 x 16 core 2.0 GHz AMD Opteron 6272,  
pomnilnik: 32 GB RAM,  
trdi disk: 512 GB SSD disk,  
operacijski sistem: Scientific Linux 6.3.

Uporabili smo **programske opreme**:

- za pretvorbo formatov formul: OpenBabel 2.3.0,
- za izdelavo konformacij molekul: Omega 2.4.3, OpenEye Inc.,
- za vizualizacijo spojin: VIDA 4.1.2, OpenEye Inc. in PyMOL 1.3, Schrödinger, LLC,
- za sidranje: FRED 2.2.5, OpenEye Inc.,
- za virtualno rešetanje na osnovi 3D-podobnosti: ROCS 3.1.2, OpenEye Inc.,
- za molekulsko dinamiko: VMD 1.9.1 in NAMD 2.9.

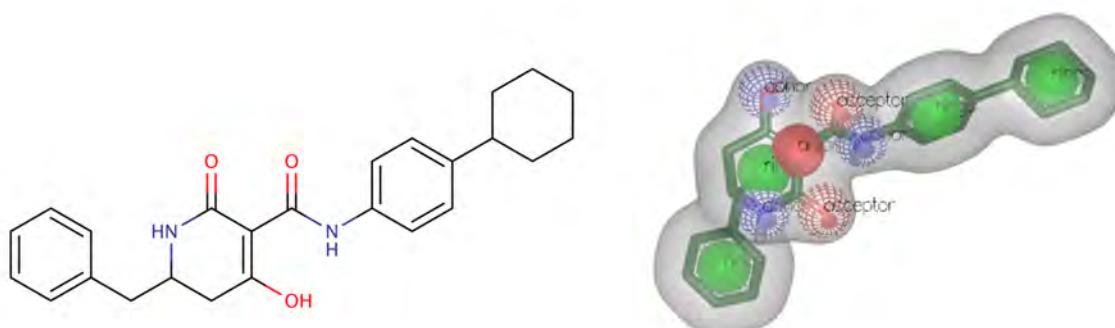
## 4. POTEK DELA

### 4.1. VIRTUALNO REŠETANJE NA OSNOVI STRUKTURE LIGANDA

Z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture liganda smo zmanjšali število spojin v virtualni knjižnici. Knjižnico spojin ZINC Drug-Like (verzija 12) smo pridobili iz prosto dostopne podatkovne baze ZINC (<http://zinc.docking.org/>). Na začetku je vsebovala nekaj več kot 10.000.000 spojin, ki so ustrezale tem fizikalno-kemijskim lastnostim:

- molekulska masa med 150 in 500,
- logP manjši kot 5,
- število vrtljivih vezi manjše kot 7,
- celotna polarna površina manjša kot  $150 \text{ \AA}^2$  \*,
- število donorjev H-vezi manjše kot 5,
- število akceptorjev H-vezi manjše kot 10.

Kot predlogo za virtualno rešetanje smo uporabili spojino, ki jo je v svojem članku omenil Peukert (12). V članku je spojina omenjena pod oznako **4d** in med preiskovanimi izkazuje najboljšo zaviralno aktivnost proti encimu UPPs ( $\text{IC}_{50} = 0,04 \mu\text{M}$ ). Spojino najdemo tudi v podatkovni bazi ChEMBL (29, 30) med znanimi zaviralcji encima UPPs, od koder smo tudi pridobili \*.smi format. Tega smo uporabili za izdelavo predloge na osnovi oblike in volumna v programu ROCS.



**Slika 6:** Spojina, ki smo jo uporabili kot predlogo za virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda s programom ROCS

\*  $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$

Simulacijo smo pognali z ukazom:

```
rocs -query spojina_1_query.sq -dbase zinc-druglike.oeb.gz -rankby tanimotoCombo  
-besthits 100000 -prefix rocs_hits_1.sdf.gz
```

Razlaga ukaza:

- query: datoteka, ki služi kot predloga za virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda
- dbase: naša začetna knjižnica spojin
- rankby: določitev algoritma, na podlagi katerega bo potekala razvrstitev
- besthits: količina zadetkov, ki jih želimo obdržati
- prefix: želeno ime nove, obogatene knjižnice

Kot rezultat smo dobili novo, obogateno knjižnico (*rocs\_hits\_1.sdf.gz*), ki je vsebovala najboljših 100.000 spojin. Preden smo knjižnico lahko uporabili pri nadaljnjem računanju, smo jo obdelali s programom OMEGA. Tako smo pripravili vse mogoče energijsko ugodne konformacije za vsako spojino. Ukaz:

```
omega2 -in rocs_hits_1.sdf.gz -out rocs_hits_3D.oeb.gz -maxconfs 300 -pvmconf  
/home/skupno/hosts
```

Razlaga ukaza:

- in: vhodna datoteka
- out: izhodna datoteka
- maxconfs: določitev najvišjega števila generiranih konformacij ene spojine
- pvmconf: pot do datoteke, na kateri je zapisano, koliko procesorjev lahko uporabi program pri računanju

## 4.2. PRVA SIMULACIJA MOLEKULSKE DINAMIKE

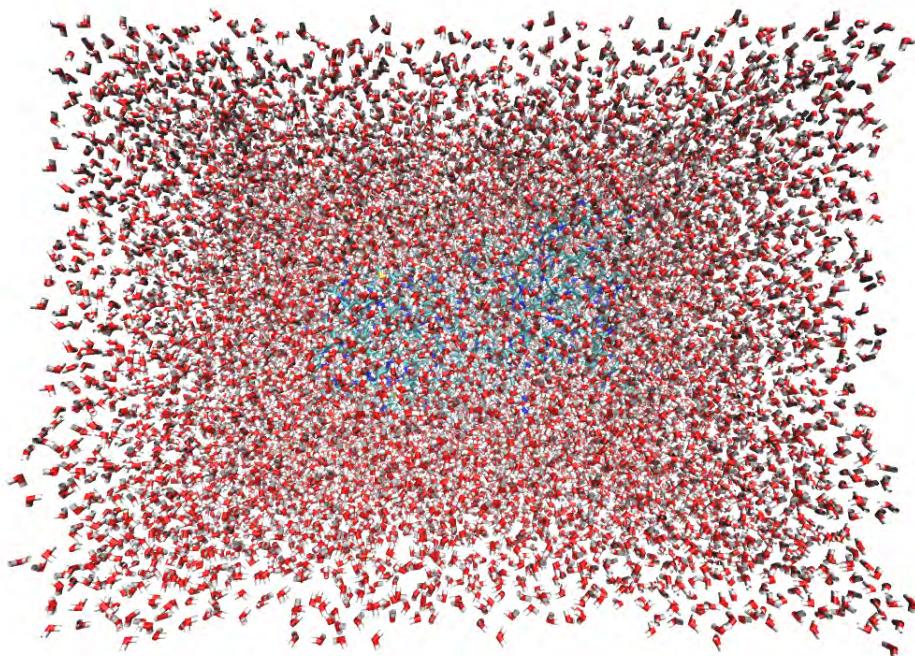
Iz banke proteinov ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) smo pridobili kristalno strukturo encima UPPs (\*.pdb) z znano strukturo zaviralca [PDB: 3TH8]. Encim UPPs smo odprli s programom VMD in v

simulacijo dodali molekule topila in proti-ione (Extensions → Modeling → Automatic PSF Builder).

S programom VMD smo tudi pripravili \*.namd datoteko, ki služi kot tekstovno navodilo za simulacijo molekulske dinamike. Odločili smo se, da bomo za minimizacijo namenili 100.000 korakov, za računanje molekulske dinamike 1.000.000 korakov (pri čemer je 1 korak enak 1 fs) in da bo simulacija potekala pri 310 K (Extension → Simulation → NAMD Graphical Interface). Skupna simulacija je potekala 1,1 ns. Zagnali smo jo z ukazom:

```
namd2 3TH8_ecoli_autopsf_modified.namd
```

Rezultat sta bili dve datoteki s končnicami \*.dcd in \*.psf.



**Slika 7:** Encim UPPs, obdan z vodnimi molekulami in proti-ioni, pripravljen za računanje molekulske dinamike

### 4.3. PRIPRAVA KONFORMACIJ V RAZLIČNIH ČASOVNIH TRENUTKIH

Po končani simulaciji smo nato prej omenjeni datoteki ponovno odprli s programom VMD. Izračunali smo, kako se s časom spreminja posamezne energije proteina (Extensions → Analysis → NAMD Energy) in kako se s časom spreminja RMSD (Extensions → Analysis → RMSD Trajectory Tool).

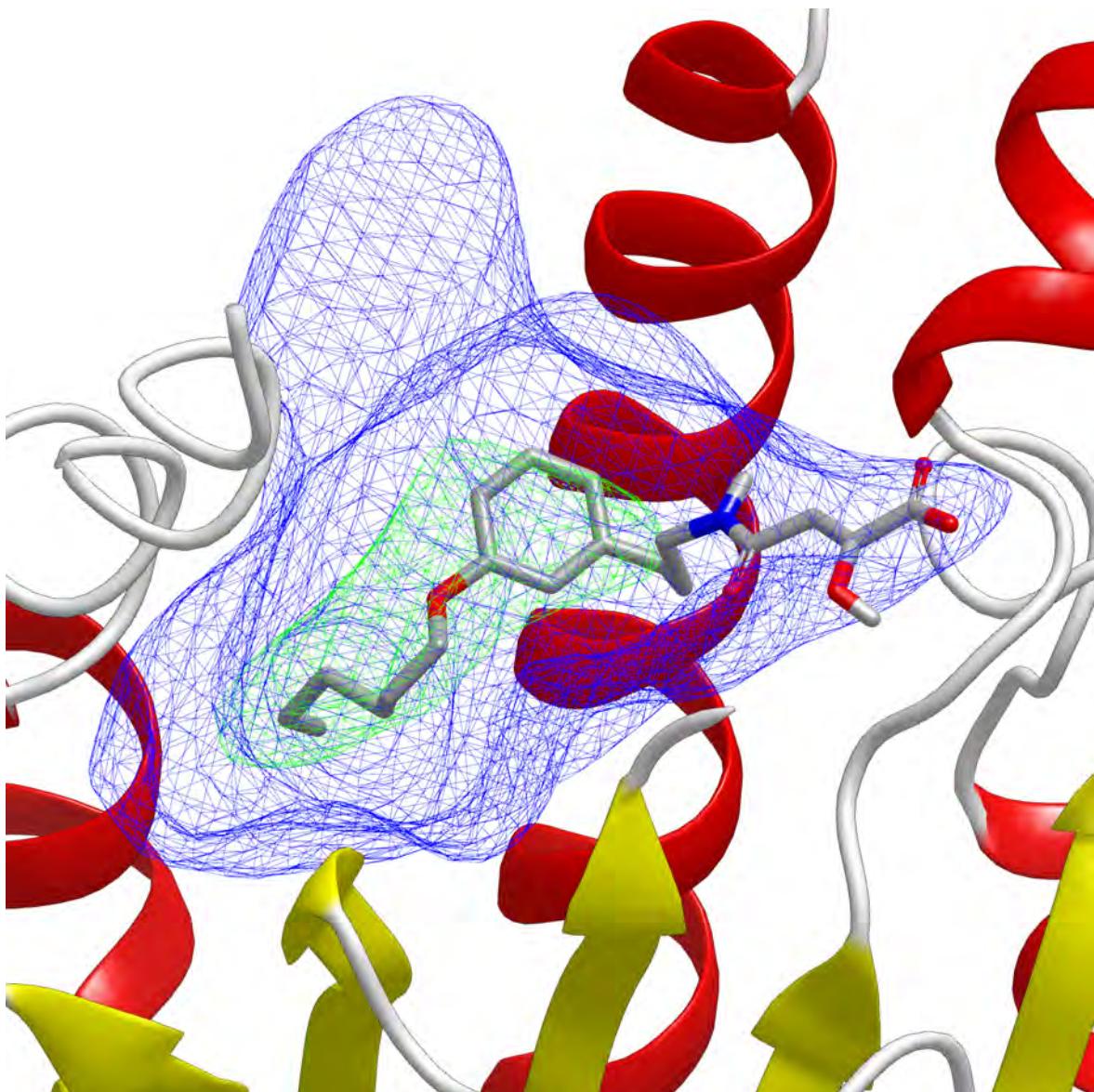
Na podlagi grafa, ki predstavlja RMSD v odvisnosti od časovnih korakov (priloga: slika 15) smo se odločili, da bomo pri sidranju uporabili te časovne konformacije encima UPPs:

- takoj po minimizaciji (korak 200),
- na koncu simulacije molekulske dinamike (korak 2199),
- tri konformacije ob vmesnih korakih simulacije (koraki 680, 1400 in 2100).

Pri vsakemu časovnemu trenutku, za katerega smo se odločili, smo v programu VMD shranili koordinate encima (\*.pdb). Tako smo dobili pet različnih konformacij encima, vsaka je bila posneta v svojem časovnem trenutku. Da smo lahko v vsako konformacijo prekopirali vezan ligand, smo morali najprej v programu PyMol med seboj poravnati koordinate encimov. Prisotnost liganda je bila nujna, saj ga je pozneje, pri izdelavi vezavnega mesta, prepoznaš programski vmesnik MAKE\_RECECTOR.

### 4.4. SIDRANJE V KRISTALNO STRUKTURO

Encim UPPs smo odprli s programskega vmesnika MAKE\_RECECTOR, ki se uporablja za pripravo aktivnega mesta v encimu. Definirali smo, katere strukture pripadajo encimu in katera je ligand. Na podlagi tega je nato program določil območje v aktivnem mestu, kamor se bodo vezale spojine. Če je bilo treba, smo spremenili velikost območja in znotraj njega določili notranjo ( $119 \text{ \AA}^3$ ) in zunano prostorno ( $1652 \text{ \AA}^3$ ). Notranja je območje, znotraj katerega naj bi bili zaviralci encima, zunana prostornina pa je območje, znotraj katerega se sidranje še dopušča. V postopku priprave aktivnega mesta je nato sledil pregled orientacije ključnih aminokislinskih ostankov. Na koncu smo opravili poskusno sidranje učinkovine v pripravljeni aktivno mesto in s tem preverili ustreznost vezave. Projekt smo shranili z imenom *vezavno\_mesto\_2.oeb*.



Slika 8: Vezavno območje v aktivnem mestu kristalne strukture encima UPPs (modra barva predstavlja zunaj, zelena pa notranjo prostornino)

Sidranje smo zagnali z ukazom:

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz -rec vezavno_mesto_2.oeb  
-pvmconf /home/skupno/hosts
```

Razlaga ukaza:

- dbase: knjižnica spojin za sidranje
- rec: datoteka, v kateri je opredeljeno aktivno mesto

-pvmconf: pot do datoteke, v kateri je zapisano, koliko procesorjev lahko uporabi program pri računanju

## 4.5. SIDRANJE V KONFORMACIJE V RAZLIČNIH ČASOVNIH TRENUTKIH

Postopek priprave aktivnega mesta je opisan pod točko 4.4. Aktivna mesta smo pripravili za vseh pet različnih časovnih konformacij encima. Shranili smo jih pod imeni:

3TH8\_200\_al\_ligand\_vm.oeb,  
 3TH8\_680\_al\_ligand\_vm.oeb,  
 3TH8\_1400\_al\_ligand\_vm.oeb,  
 3TH8\_2100\_al\_ligand\_vm.oeb,  
 3TH8\_2199\_al\_ligand\_vm.oeb.

Podatki o velikosti notranje in zunanje prostornine so predstavljeni v preglednici I.

**Preglednica I:** Podatki o velikosti notranje in zunanje površine za pet različnih konformacij encima UPPs v različnih časovnih trenutkih

Konformacija encima	Notranja prostornina [ $\text{\AA}^3$ ]	Zunanja prostornina [ $\text{\AA}^3$ ]
3TH8_200	170	4017
3TH8_680	255	4655
3TH8_1400	241	4177
3TH8_2100	339	3994
3TH8_2199	243	4136

Sidranje smo opravili s programom FRED. Uporabili smo ukaze:

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz
-rec 3TH8_200_al_ligand_vm.oeb -pvmconf /home/skupno/hosts
```

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz
-rec 3TH8_680_al_ligand_vm.oeb -pvmconf /home/skupno/hosts
```

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz
-rec 3TH8_1400_al_ligand_vm.oeb -pvmconf /home/skupno/hosts
```

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz  
-rec 3TH8_2100_al_ligand_vm.oeb -pvmconf /home/skupno/hosts
```

```
fred -dbase /home/urbanb/ROCS/rocs_hits_3D.oeb.gz  
-rec 3TH8_2199_al_ligand_vm.oeb -pvmconf /home/skupno/hosts
```

## 4.6. OCENA VEZAVNE ENERGIJE S POMOČJO MOLEKULSKE DINAMIKE

Na koncu smo ocenili še vezavno energijo spojine, ki je bila najboljše ocenjena pri sidranju. To smo naredili za vseh pet časovnih konformacij encima in za kristalno strukturo.

Datoteko z receptorjem in najboljše ocenjeno spojino smo odprli v programu VIDA in vsako posebej shranili v \*.pdb obliku (LIG.pdb in rec.pdb). Ko smo v tekstovnem urejevalniku uredili datoteko LIG.pdb, smo jo s programom OpenBabel 2.3 (31) pretvorili v format \*.mol2. Tudi to datoteko smo morali preurediti v tekstovni zapis. Nato smo jo naložili na internetno stran [www.paramchem.org](http://www.paramchem.org) in tako pridobili \*.str datoteko, ki vsebuje parametre atomov molekule.

Z naslednjimi ukazi smo iz datoteke rec.pdb izvlekli vse podatke o atomih in jih združili s podatki liganda.

```
cat rec.pdb | grep ATOM > 3TH8_200.pdb  
cat LIG.pdb >> 3TH8_200.pdb
```

### Razlaga ukaza:

cat: izpiše vsebino datoteke

grep: iz datoteke izvleče vrstice, ki vsebujejo določeno geslo (v našem primeru izvleče vse vrstice z gesлом »ATOM«)

>: ustvari novo datoteko in vanjo preslika določene zadeve

>>: vrstice doda na koncu te datoteke

Na novo ustvarjena datoteka 3TH8\_200.pdb vsebuje koordinate vseh atomov encima in liganda. Odprli smo jo v programu VMD. V primerjavi s postopkom, opisanim pod točko 4.2, smo poleg molekul topila in proti-ionov dodali tudi datoteko \*.str, pridobljeno s pomočjo spletnne strani [www.paramchem.org](http://www.paramchem.org), in \*.rtf datoteko. Datoteka \*.str vsebuje parametre atomov molekule, medtem ko datoteka \*.rtf vsebuje podatke o topologiji molekule. Preden smo zapisali datoteko \*.namd, smo dodali še datoteko \*.prm, ki vsebuje parametre za makromolekule. Simulacije smo zagnali z ukazi:

```
namd2 +p2 3TH8_200.autopsf.namd
```

```
namd2 +p2 3TH8_680.autopsf.namd
```

```
namd2 +p2 3TH8_1400.autopsf.namd
```

```
namd2 +p2 3TH8_2100.autopsf.namd
```

```
namd2 +p2 3TH8_2199.autopsf.namd
```

#### Razlaga ukaza:

+p2: s tem parametrom določimo, koliko procesorjev naj uporabi računalnik pri simulaciji

Rezultate predstavljajo datoteke \*.psf, ki smo jih ponovno zagnali s programom VMD in izračunali, kako se s časom spreminja elektrostatska in Van der Waalsova energija (Extensions → Analysis → NAMD Energy).

## 4.7. *In vitro* TESTIRANJE

Naročili smo nekaj najboljših spojin iz vsakega sidranja in jih poslali na *in vitro* testiranje na Inštitut za biokemijo in molekulsko ter celično biofiziko Univerze Paris-Sud, Francija.

Rezultate, ki smo jih dobili po sidranju v različne konformacije encima, smo pregledali in izbrali spojine, ki imajo logP manjši kot 5. To smo naredili z orodjem *obprop* programa OpenBabel. S tem orodjem pridobimo nekatere lastnosti spojine, kot so molekulska formula, molekulska masa, zapis SMILES, število atomov, logP in podobno. Primer je predstavljen na sliki 8. Spojine so morale biti komercialno dostopne. To smo preverili v podatkovni bazi ZINC. Skupno smo naročili in poslali na testiranje 24 spojin (priloga: preglednica V).

```
name          ZINC08779723_9
formula       C27H25FN4O3
mol_weight    472.511
exact_mass    472.191
canonical_SMILES O=C1N[C@H](C(=O)N1CC(=O)c1cc(n(c1C)c1ccc(c(c1F)C)C)Cc1c[nH]c2c1cccc2
ZINC08779723_9

InChI          InChI=1S/C27H25FN4O3/c1-15-8-9-19(12-22(15)28)32-16(2)10-21(17(32)3)25
(33)14-31-26(34)24(30-27(31)35)11-18-13-29-23-7-5-4-6-20(18)23/h4-10,12-13,24,29H,11,14
H2,1-3H3,(H,30,35)/t24-/m1/s1

num_atoms     60
num_bonds     64
num_residues  1
sequence      <0>
num_rings     5
logP          4.6354
PSA           87.2
MR            138.594
$$$$
```

Slika 9: Primer uporabe orodja *obprop* programa OpenBabel

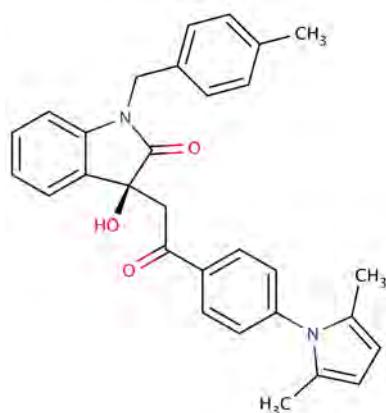
## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. NAJBOLJŠE OCENJENE SPOJINE

Skupno smo pri diplomski nalogi izvedli eno virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda in šest virtualnih rešetanj na osnovi strukture tarče oziroma sidranj (pet sidranj v konformacije ob različnih časovnih trenutkih v dinamiki in eno sidranje v kristalno strukturo encima UPPs). Virtualno rešetanje na osnovi strukture liganda nam je služilo za obogatitev knjižnice, ki smo jo pozneje uporabili pri vseh šestih sidranjih. Število spojin v knjižnici smo zmanjšali za 100-krat.

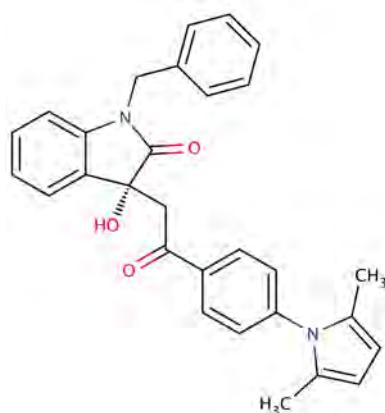
Pri vsakem sidranju smo rezultate omejili na 1000 najboljše ocenjenih spojin. Od vsakega rešetanja smo vzeli najboljše ocenjeno spojino in ocenili vezavno energijo. Najboljše spojine iz vsakega izmed šestih rešetanj so predstavljene v preglednici II:

**Preglednica II:** Seznam najboljše ocenjenih spojin po sidranju (prikazani so struktura formula spojine, zaporedna številka, koda iz podatkovne baze ZINC in časovni trenutek encima, v katerega smo sidrali spojino)

**1**

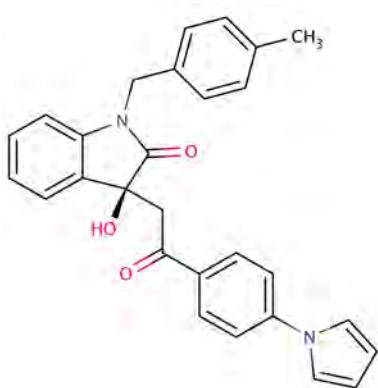
ZINC04124730\_192

200

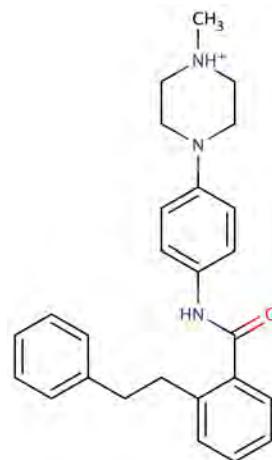
**2**

ZINC04124721\_156

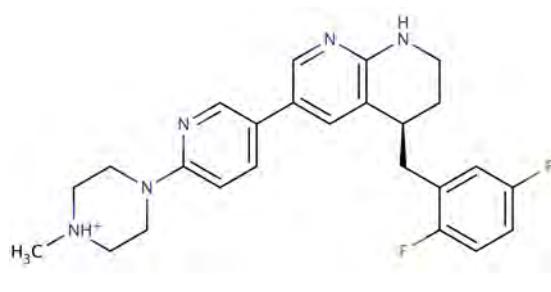
680



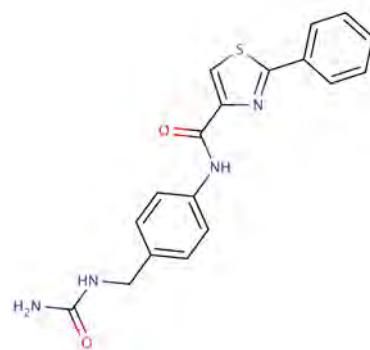
**3**  
ZINC04124735\_184  
1400



**4**  
ZINC06820694\_241  
2100



**5**  
ZINC49808510\_2  
2199



**6**  
ZINC67241399\_30  
Kristalna oblika

## 5.2. PRIMERJAVA STRUKTUR

Spojine **1**, **2** in **3** so si zelo podobne. Vsebujejo dva terciarna dušika, ki sta sterično ovirana in zaradi tega težje tvorita vodikove vezi. Večji del molekule je tako relativno nepolaren, hidrofoben, z izjemo hidroksilne skupine oksindolnega dela – OH skupina je hidrofilna polarna skupina, ki lahko tvori vodikovo vez z aktivnim mestom.

Njihova struktura se razlikuje v treh metilnih skupinah – spojini **1** in **3** imata metilno skupino na para mestu *N*-benzilnega sistema, medtem ko *N*-benzilni sistem spojine **2** ni

substituiran. Prisotnost metilne skupine, sicer le za malo, poveča nepolarnost spojine. Na drugi strani imata spojini **1** in **2** 2,5-dimetil substituiran pirolni sistem, medtem ko spojina **3** na pirolnem obroču nima metilnih substituentov – to naredi dušik v spojini **3** manj nukleofilen in zato težje tvori vodikovo vez, po drugi strani pa je pirolni dušik v spojinah **1** in **2** veliko bolj sterično oviran.

Spojine **4**, **5** in **6** so strukturno bistveno bolj raznolike. Spojina **4** je v bistvu zelo nepolarna, vsebuje amidno vez, tri fenilne obroče, povezano ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub> in *N*-metiliran piperazinski sistem. Slednji je protoniran in zato precej polaren. Spojina nastopa v obliki soli in je zato zelo verjetno tudi topna v vodi.

Spojina **5** vsebuje veliko dušikov, ki so v aromatskih sistemih, kot je v tem primeru 2,5-disubstituiran piridin, ki je bazičen in lahko sprejema protone. Spojina vsebuje tudi piridin s pripojenim pipiridinskim obročem in dušik v piperidinskem sistemu. Zraven je še nabit *N*-metiliran piperazinski sistem. Vse to naredi molekulo zelo polorno. Spojina vsebuje tudi benzilno skupino z dvema fluorovima atomoma, ki lahko tvorita vodikove vezi z atomi aktivnega mesta. Na splošno so floridni atomi vedno zanimivi s farmakološkega vidika. Med drugim je C-F vez približno enako dolga kot C-H vez in jo lahko posnema. Ker je tudi dosti močnejša in ker encimi in mikroorganizmi te zamenjave ne prepozna, lahko z zamenjavo zaustavimo nadaljne metabolne procese (32).

Spojino **6** lahko predstavimo kot *N*-substituiran derivat sečnine. Na alkilni verigi ima vezan nepolarni benzilni substituent, ki se prek amidne vezi povezuje s tiazolnim obročem, ki je substituiran s fenilnim substituentom. Spojina vsebuje dve NH skupini in eno NH<sub>2</sub> skupino, dve karbonilni skupini in v tiazolaktonskem obroču še žveplov in dušikov atom, kar naredi molekulo polorno.

V preglednici III so prikazane ocene najboljše spojine v vsakem časovnem trenutku dinamike encima UPPs. Spojine so bile ocenjene s cenilno funkcijo Chemgauss3. Primerjava pokaže, da je bila spojina **2** najboljše ocenjena med vsemi (najbolj negativna vrednost). Spojino smo sidrali v encim po 680 korakih simulacije molekulske dinamike. V primerjavi s spojinama **1** in **3** (ti dve spojini imata zelo podobno strukturo) nastane razlika pri prispevku na podlagi komplementarnosti oblike liganda k obliku aktivnega mesta. Ta razlika bi lahko bila posledica različne konfiguracije na kiralmem centru – spojini **1** in **3** imata relativno konfiguracijo (*S*), spojina **2** pa (*R*). Med prebiranjem literature smo

zasledili kar nekaj primerov, pri katerih imajo enantiomerne molekule zelo različno farmakološko aktivnost (33).

Glede na ocene cenilne funkcije Chemgauss3 je najslabše ocenjena spojina **6**, ki smo jo sidrali v kristalno strukturo. Spojina **6** ima predvsem slaba prispevka komplementarnosti oblik in ligand-topilo, medtem ko ima daleč najboljši prispevek ligand-protein.

**Preglednica III:** Ocene s cenilno funkcijo Chemgauss3

Spojina	Chemgauss3					
	»Steric«	»Desolvation«	»Acceptor«	»Donor«	»Metal«	Skupna
1	-105,9932	7,3352	-1,3586	-0,0124	0	-100,0289
<b>2</b>	<b>-120,0907</b>	<b>7,952</b>	<b>-0,0045</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>-112,1433</b>
3	-113,7374	7,2547	0	0	0	-106,4827
4	-107,8419	5,4875	0	-0,0001	0	-102,3544
5	-108,7929	11,2393	-10,1163	-1,323	0	-108,9929
6	-77,9866	13,7311	-7,1241	-19,0809	0	-90,4606

### 5.3. OCENA VEZAVNE ENERGIJE Z MOLEKULSKO DINAMIKO

Cenilna funkcija Chemgauss3 je empirična funkcija, ki oceni posamezne člene v spojnini in jih nato sešteje. Prispevek posameznih členov pa je pridobljen in umerjen z že znanimi kristalnimi strukturami (28). Vezavne energije smo zato ocenili še s pomočjo molekulske dinamike (preglednica IV).

**Preglednica IV:** Ocene vezavnih energij z molekulsko dinamiko

Spojina	Elektrostatska [kcal/mol] <sup>*</sup>	VdW [kcal/mol]	Skupna [kcal/mol]
1	-35,31958492	-47,06266382	-82,38224874
2	-25,77244372	-44,65836633	-70,43081005
3	-16,96145075	-47,96073367	-64,92218442
4	19,43660452	-48,17281407	-28,73620955
5	15,49940704	-42,9387598	-27,43935276
<b>6</b>	<b>-50,48419849</b>	<b>-36,97008392</b>	<b>-87,45428241</b>

Pri oceni vezavne energije z molekulsko dinamiko smo izračunali prispevek elektrostatskih (računanje poteka po Coulombovem zakonu) in Van der Waalsovih vezi (po Lennard-Jonesovem 6-12 potencialu) (27). Rezultati so predstavljeni posebej in kot seštevek obeh

\* 1 kcal = 4,2 kJ

prispevkov. Pri tem izračunu smo dobili obratne rezultate, kot pri oceni s cenilno funkcijo Chemgauss3. Tu je bila najbolje ocenjena spojina **6** (sidrana v kristalno strukturo), ki je bila pri prejšnjem izračunu ocenjena najslabše. Program za sidranje je za spojino **6** napovedal neugodne stericne interakcije, kar je v tem primeru predvsem posledica rigidne obravnave proteina. Molekulska dinamika pa obravnava protein fleksibilno in omogoči simuliranje induciranega prileganja (angl. induced fit) in posledično ugodnejšo napoved vezave.

Razlika v rezultatih je pričakovana. Cenilne funkcije, ki se uporabljajo pri sidranju, so zelo grobe, saj je pri njih pomembnejša hitrost, ker se uporabljajo za rešetanje. Poleg tega ne upoštevajo fleksibilnosti proteina, voda pa je v najboljšem primeru upoštevana kot člen v enačbi za cenilno funkcijo (pri cenilni funkciji Chemgauss3 kot prispevek ligand-topilo). Pri molekulske dinamiki pa so sile med delci in potencialna energija definirani z molekulsko mehaniko polja sil. Mehanika polja sil predstavlja parametre, ki opisujejo prispevke posameznih atomskih sli, ki urejajo molekulsko dinamiko. Ti parametri so: prepoznavanje idealne togosti in dolžine vzmeti, ki opisujejo kemijske vezi in kemijske kote; določitev najboljših delnih nabojev atoma, ki se uporabijo za izračun elektrostatične-interakcijske energije; določitev pravilnega Van der Waalsovega atomskega radija in podobno. Molekulska dinamika je zato časovno zahtevnejši postopek, vendar da bolj natančen izračun, poleg tega pa upošteva tudi prisotnost vode in fleksibilnost proteina (27).

## 5.4. PRIMERJAVA VEZAVNIH MEST

Ob grafičnem pregledu vezavnih mest s programom PyMol lahko ugotovimo, da pri vseh petih konformacijah v časovnih trenutkih encima UPPs pride do nekaterih sprememb v orientaciji in položaju aminokislin. Najprej smo s programom PyMol pogledali položaj znanega zaviralca (spojava TH9 iz članka (34)). To spojino smo skupaj z encimom pridobili iz podatkovne baze PDB [PDB: 3TH8]. Na vseh slikah, na katerih so prikazana vezavna mesta (slike od 9 do 14), je zaviralec prikazan z vijolično barvo.

Glede na podatke iz članka (34) in z [www.pdb.org](http://www.pdb.org) lahko spojina TH9 v kristalni strukturi tvori vodikovo vez z aminokislino Gly29 in z glavno verigo aminokisline Phe70. Za hidrofobne interakcije pa poskrbijo aminokisline Met25, Ala47, Val50, Ala69 in Ile141. Enake rezultate glede vodikovih vezi dobimo tudi pri naši simulaciji – vodikova vez z aminokislino Gly29 je dolga 2,7 Å, z glavno verigo Phe70 pa 2,4 Å.

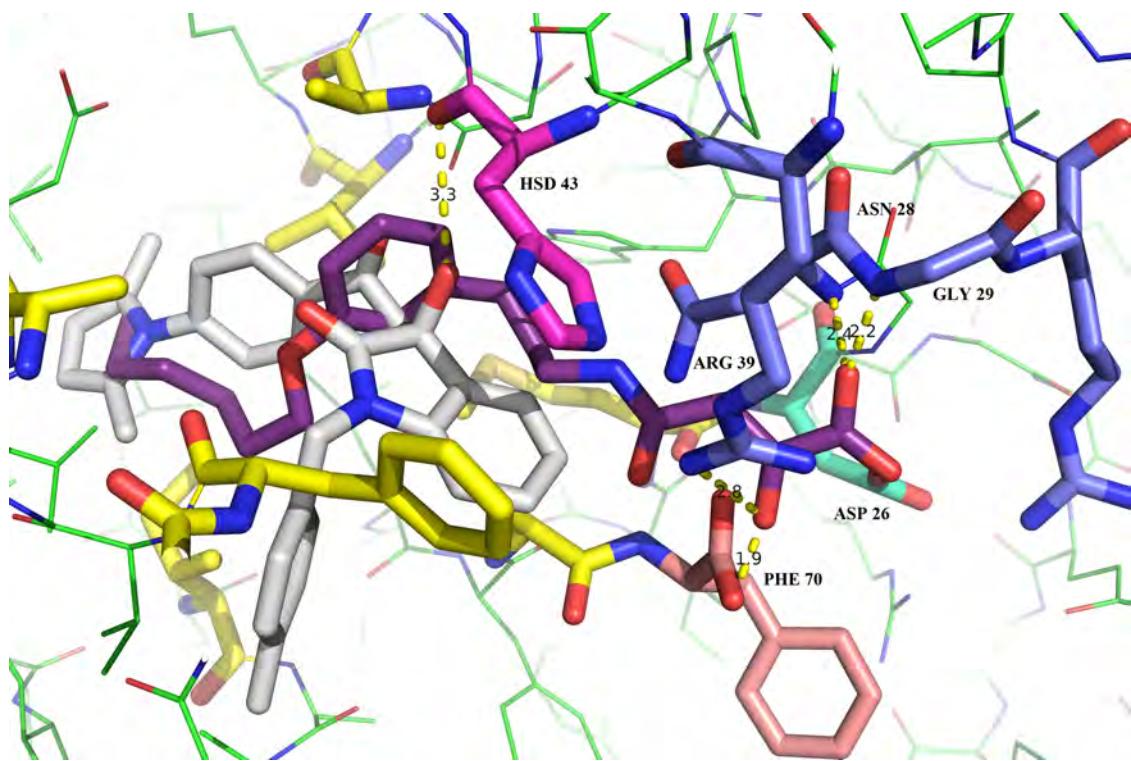
Druge časovne konformacije encima delujejo kot ugodnejše za zaviralec TH9, saj lahko v njih tvori z vezavnim mestom več vodikovih vezi:

- 200: vodikove vezi lahko tvori z glavno verigo Asn28 (2,4 Å) in Phe70 (1,9 Å), s stransko verigo Asp26 (2,9 Å) in Arg39 (2,8 Å) ter z aminokislino Gly29 (2,2 Å);
- 680: vodikove vezi lahko tvori z glavno verigo Asn28 (2,8 Å) in Phe70 (0,6 Å), s stransko verigo Arg39 (3,3 Å) in aminokislino Gly29 (2,0 Å);
- 1400: vodikove vezi lahko tvori z glavno verigo Asn28 (2,4 Å) in Phe70 (1,4 Å), lahko tvori dve vezi s stransko verigo Arg39 (2,4 Å in 3,1 Å) ter z aminokislino Gly29 (2,1 Å);
- 2100: vodikove vezi lahko tvori z glavno verigo Phe70 (2,1 Å), s stransko verigo Arg39 (2,7 Å) in aminokislino Gly29 (2,4 Å);
- 2199: vodikove vezi lahko tvori z glavno verigo Asn28 (2,4 Å) in Phe70 (1,9 Å), s stransko verigo Asp26 (2,9 Å) in Arg39 (2,8 Å) ter z aminokislino Gly29 (2,2 Å).

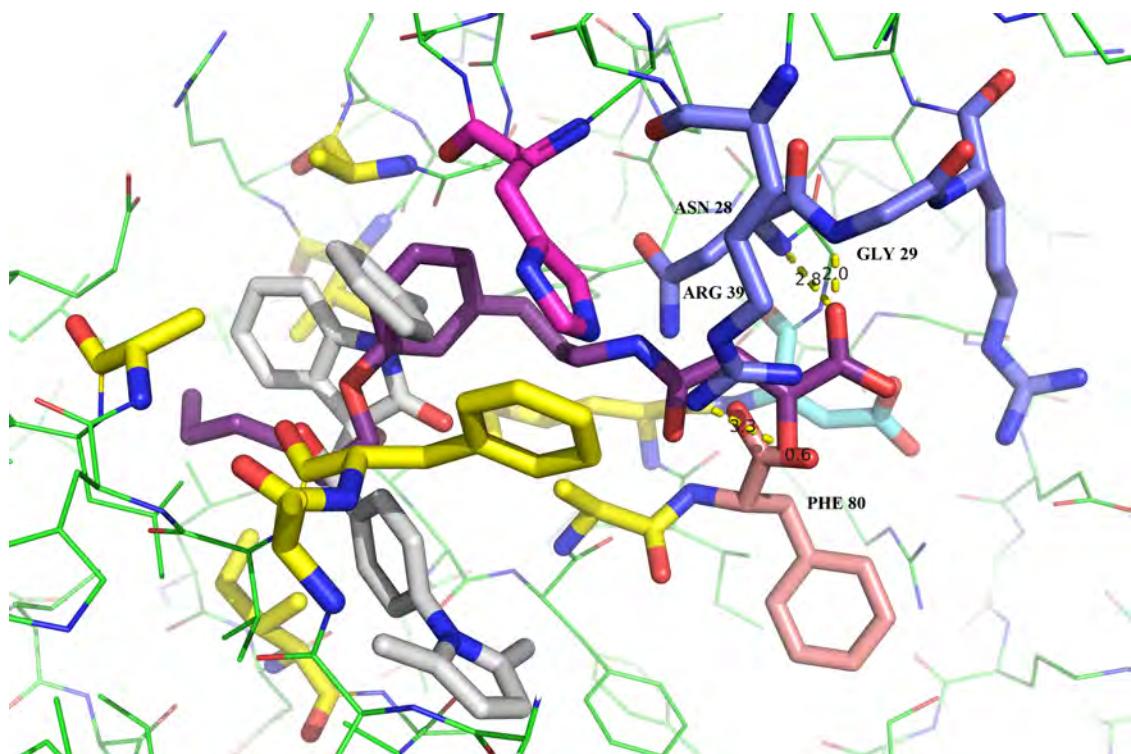
Ti rezultati kažejo na to, da je med simulacijo molekulske dinamike pri aminokislinah v vezavnem mestu prišlo do manjših premikov in do drugačne orientacije aminokislin. Glede na našo simulacijo in podatke iz članka (34) lahko zaviralec TH9 tvori vodikovo vez v vseh petih časovnih konformacijah encima in v kristalni strukturi. Zanimivo, da pri opisu vezave FPP v vezavnem mestu nismo zasledili vloge aminokisline Phe70.

Če pogledamo spojine od **1** do **6** (na slikah od 9 do 14 so označene s sivo barvo), vsako v vezavnem mestu svoje časovne konformacije, lahko ugotovimo, da le spojina **6**, ki je bila sidrana v kristalno strukturo, zavzema podoben položaj kot zaviralec TH9. Vse druge spojine (**1–5**) so orientirane popolnoma drugače in tako niso zmožne tvoriti vodikovih vezi z aminokislinami, s katerimi tvori vodikove vezi zaviralec TH9 in s katerimi tvori vodikove vezi FPP (Asn28, Gly29, Arg30, Arg39). Izjema sta spojini **1**, ki glede na našo simulacijo lahko tvori vodikovo vez z aminokislino Hsd43 (3,3 Å), in **5**, ki lahko tvori vodikovo vez z aminokislino Leu93 (3,2 Å). Vendar pa te aminokisline, vsaj glede na vezavno mesto FPP in kristalno strukturo encima UPPs, naj ne bi bile zadolžene za takšne vrste interakcij. Predvsem Leu93 spada med aminokisline, ki utrdijo vezavo liganda prek hidrofobnih interakcij.

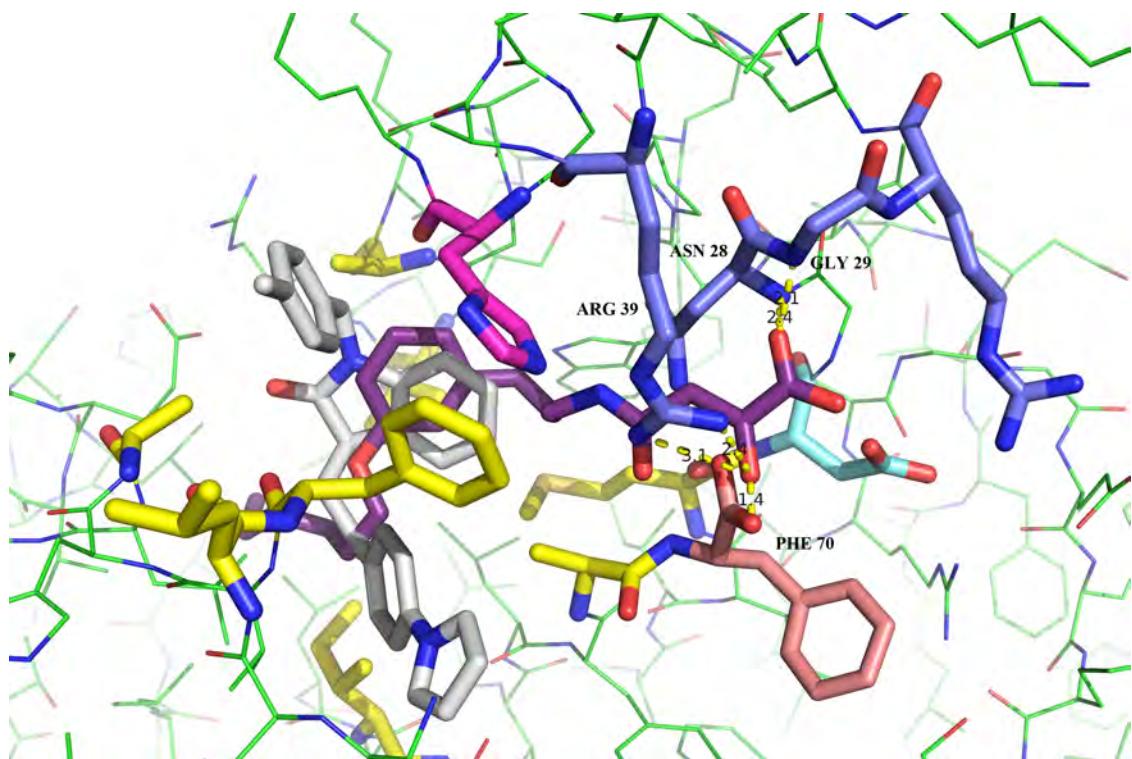
Po drugi strani spojina **6** lahko tvori štiri vodikove vezi – dve z glavno verigo aminokisline Met25 (2,8 Å in 3,1 Å) in po eno s stransko verigo Arg39 (2,9 Å) ter stransko verigo Asp26 (2,8 Å). Glede na raziskave naj bi bila aminokislina Met25 primarno odgovorna za hidrofobne interakcije.



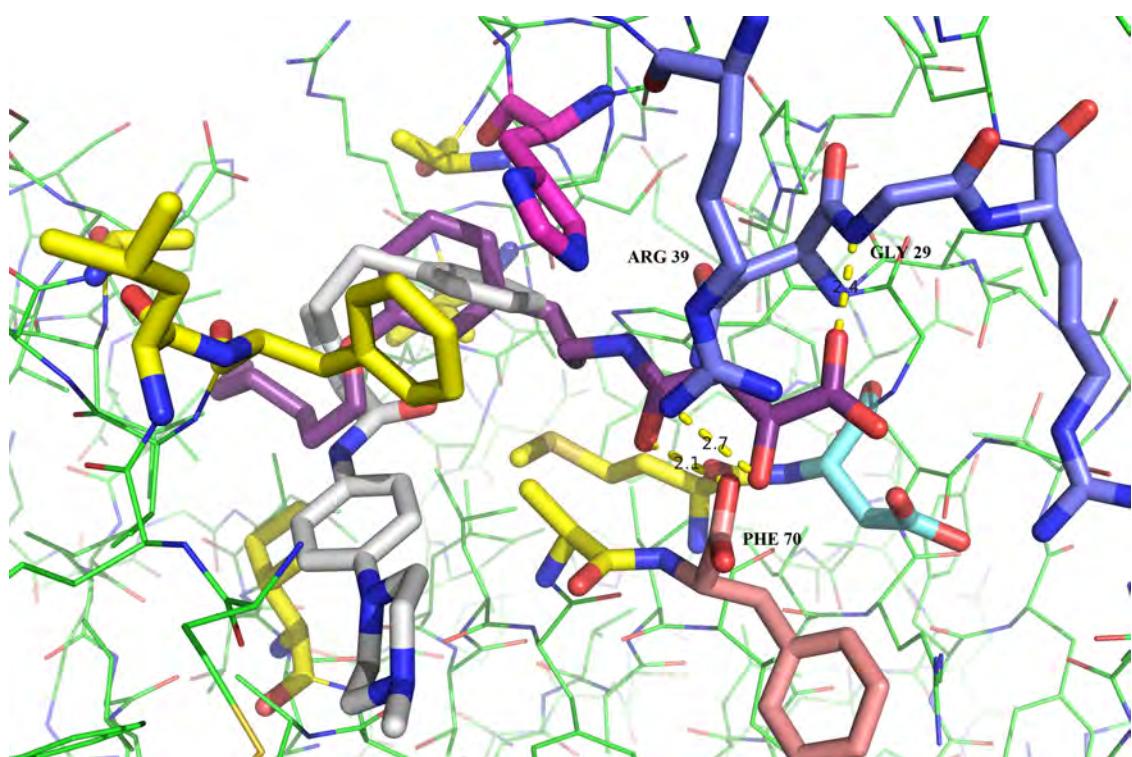
**Slika 10:** Spojina **1** v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (200) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma).



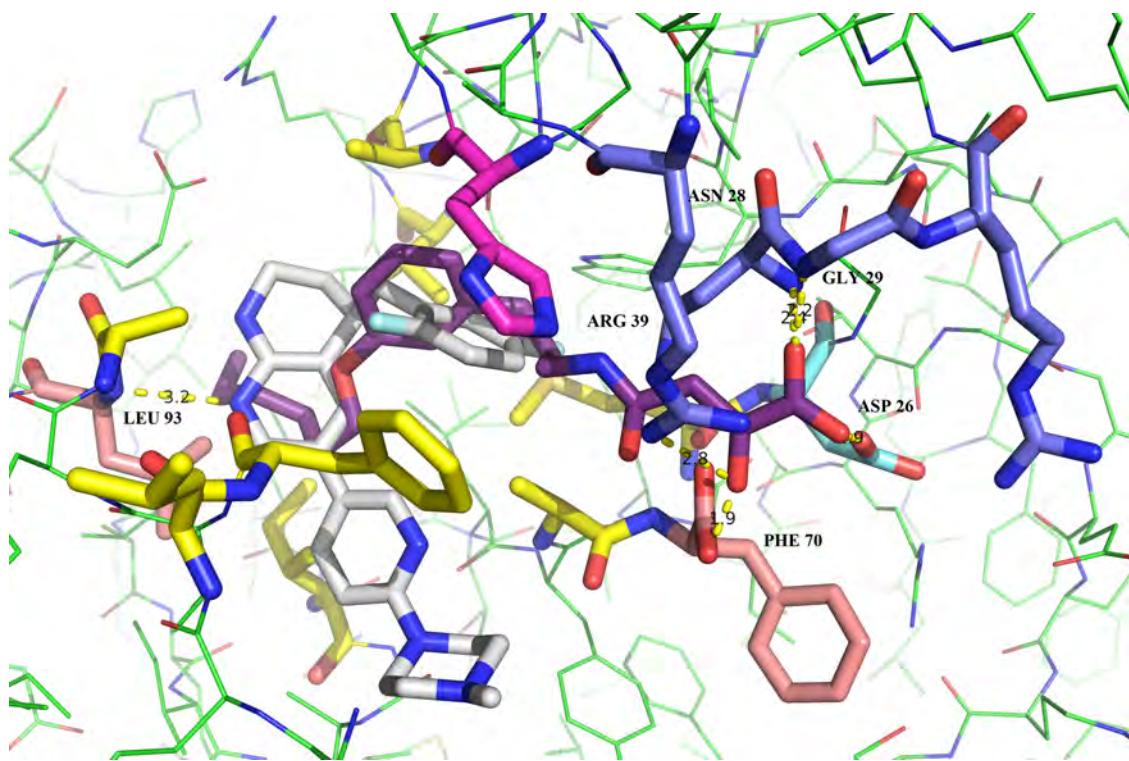
**Slika 11:** Spojina **2** v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (680) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma)



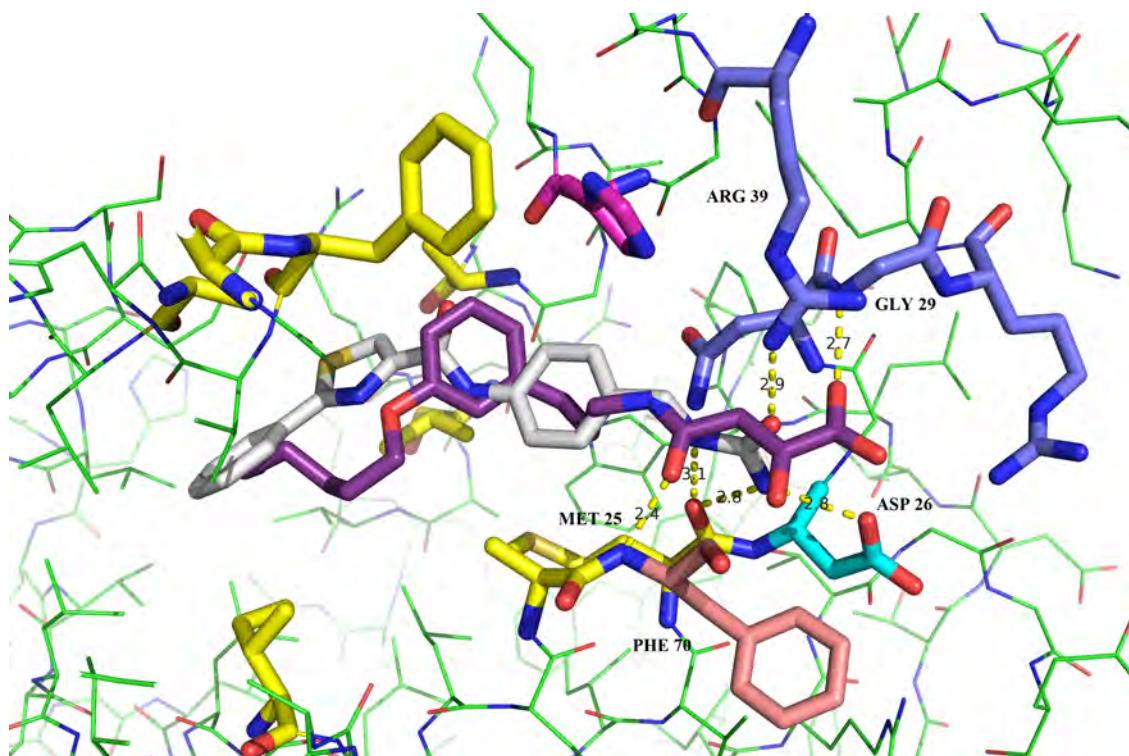
**Slika 12:** Spojina **3** v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (1400) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma)



**Slika 13:** Spojina **4** v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (2100) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma)



**Slika 14:** Spojina **5** v vezavnem mestu svoje časovne konformacije encima UPPs (2199) skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma)



**Slika 15:** Spojina **6** v vezavnem mestu kristalne strukture encima UPPs skupaj z znanim inhibitorjem TH9 (z rumeno barvo so označene aminokisline, ki ob vezavi FPP tvorijo hidrofobne interakcije, s temno modro aminokisline, ki tvorijo vodikove interakcije, s svetlo modro je označena aminokislina, ki je odgovorna za katalitično aktivnost UPPs, z roza barvo pa aminokislina, ki se ob vezavi FPP nahaja blizu C2 atoma)

## 5.5. *In vitro* TESTIRANJE

Spojine, ki smo jih poslali na testiranje v Francijo, so morale biti komercialno dostopne in imeti logP manjši kot 5. Na testiranje zato nismo poslali vseh s cenilno funkcijo Chemgauss3 najboljše ocenjenih spojin. Skupno smo naročili in poslali 24 spojine:

- štiri spojine, sidrane v konformacijo encima po 200 korakih simulacije molekulske dinamike (spojine 7, 8, 9, 10);
- štiri spojine, sidrane v konformacijo encima po 680 korakih (spojine 11, 12, 13, 14);
- tri spojine, sidrane v konformacijo encima po 1400 korakih (spojine 3, 13, 15);
- pet spojine, sidranih v konformacijo encima po 2100 korakih (spojine 4, 14, 16, 17, 18);
- štiri spojine, sidrane v konformacijo encima po 2199 korakih (spojine 19, 20, 21, 22);
- šest spojine, sidranih v kristalno strukturo encima (spojine 23, 24, 25, 26, 27, 28).

Spojini 13 in 14 sta bili med najboljše ocenjenimi pri dveh konformacijah, in sicer, spojina 13 pri 680. in 1400. koraku ter spojina 14 pri 680. in 2100. koraku simulacije. Od najboljše ocenjenih spojin (spojine 1–6) smo na testiranje poslali samo dve – spojini 3 in 4. Spojin 1 in 2 nismo poslali, ker je bil njun logP višji od 5, spojini 5 in 6 pa sta bili komercialno nedostopni.

Vse spojine, razen 3 in 4, so predstavljene v prilogi (preglednica V).

## 6. SKLEP

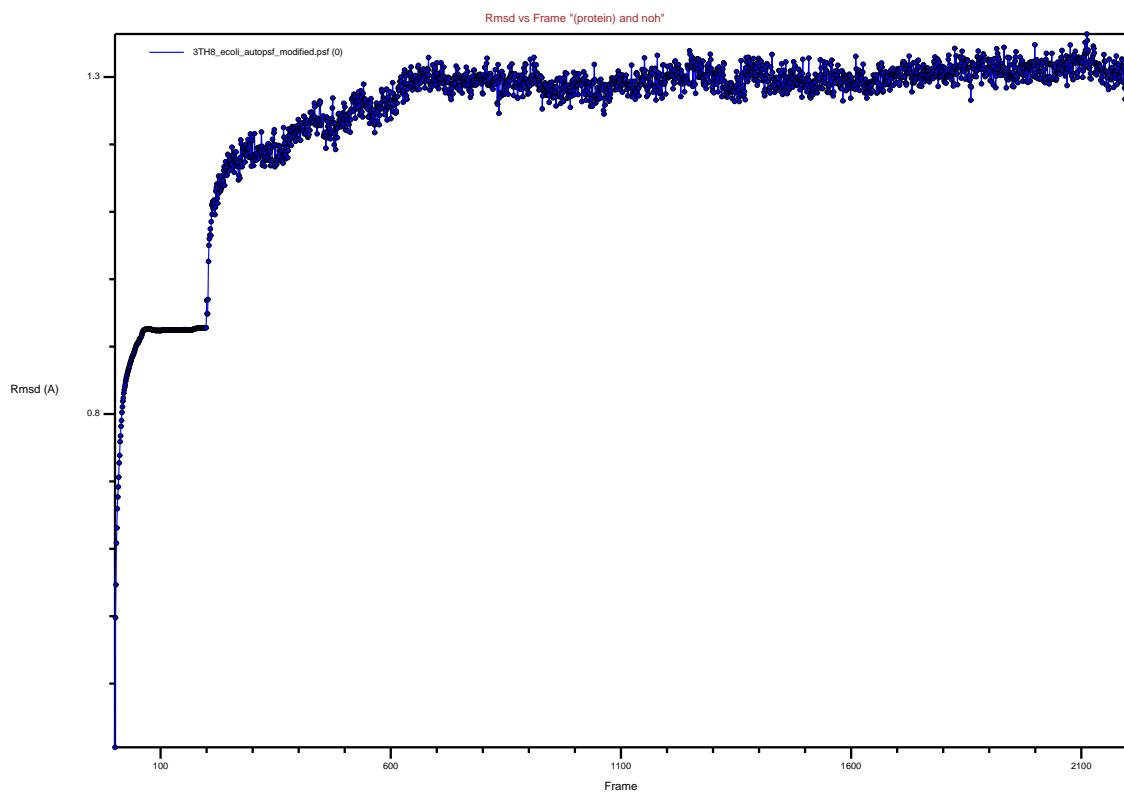
Z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture liganda in na osnovi strukture tarče smo iz izhodnih 10.000.000 spojin izluščili najboljših šest (spojine **1–6**). Vsaka izmed teh spojin je bila najboljše ocenjena v svoji časovni konformaciji encima UPPs. Rezultati so pokazali, da je encim UPPs fleksibilen in da na vezavo ligandov vplivajo tudi molekule vode.

Ugotovili smo, da obstajajo razlike v oceni s cenilno funkcijo Chemgauss3 in v oceni vezavnih energij z molekulsko dinamiko. Pri oceni s cenilno funkcijo Chemgauss3 je bila najboljše ocenjena spojina **2**, medtem ko je bila pri molekulski dinamiki najboljše ocenjena spojina **6**. Spojino **2** smo sidrali v konformacijo ob 680. koraku, medtem ko smo spojino **6** sidrali v kristalno strukturo.

Ob pregledu vezavnega mesta z računalniškim programom smo ugotovili, da le spojina **6**, sidrana v kristalno strukturo, kaže enako orientiranost kot znani zaviralec TH9 in kot FPP. Tako lahko spojina **6** tvori štiri vodikove vezi, in to z istimi aminokislinami (Asn28, Gly29, Arg30 in Arg39) kot zaviralec TH9 in kot FPP. Spojine **1–5** so orientirane drugače in niso zmožne tvoriti vodikovih vezi. Hkrati pa njihova orientiranost kaže na to, da verjetno niso sposobne tvoriti hidrofobnih interakcij z aminokislinami, ki so odgovorne za te interakcije pri vezavi FPP (Met 25, Ala47, Val50, Ala69, Leu85, Leu88, Phe89, Ala92 in Ile141).

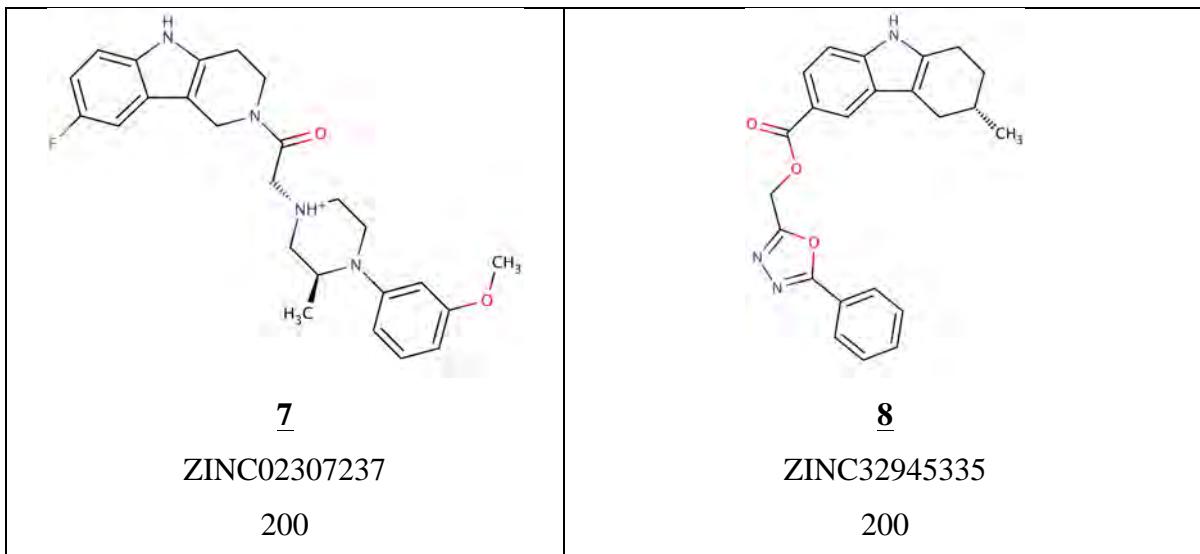
Glede na rezultate ocene vezave z molekulsko dinamiko in pregleda vezavnih mest z računalniškim programom lahko ugotovimo, da je spojina **6** potencialno najboljši zaviralec encima UPPs.

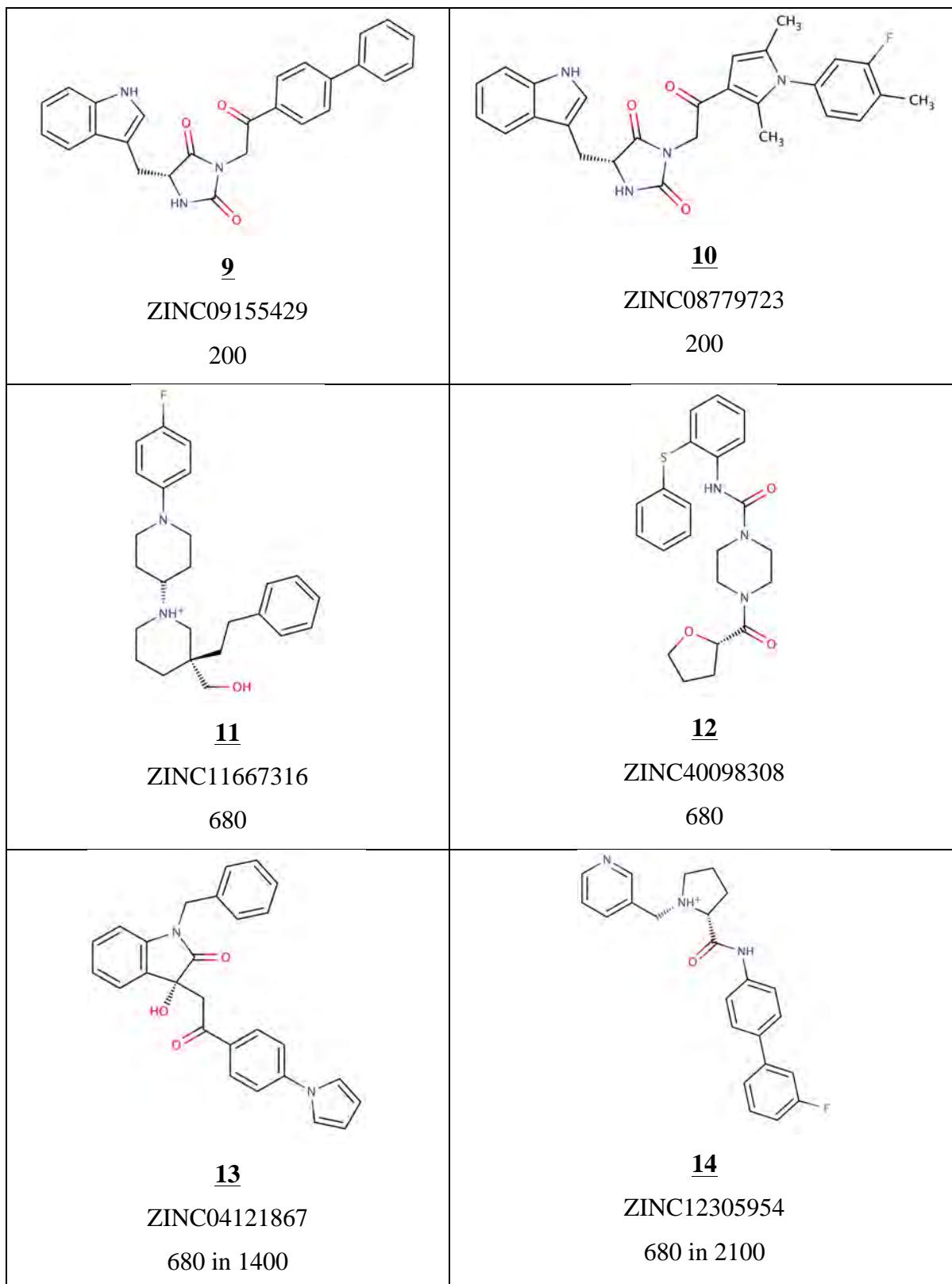
## PRILOGA

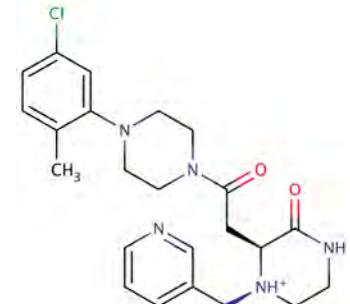
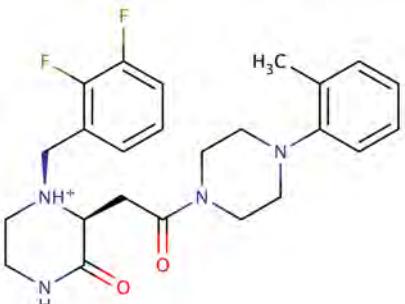
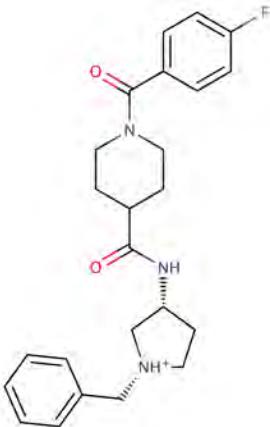
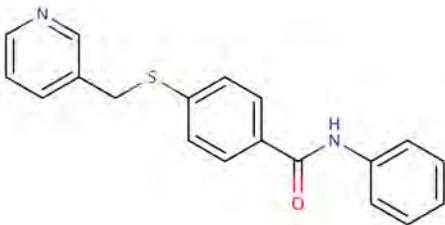
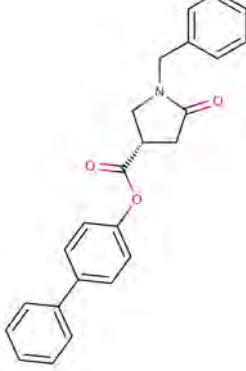
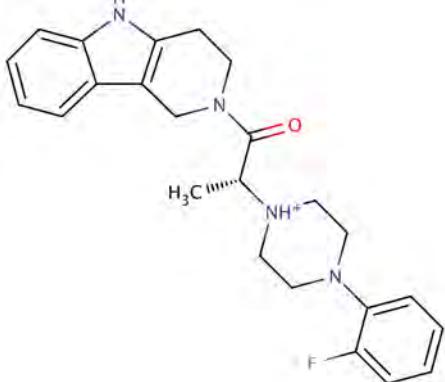


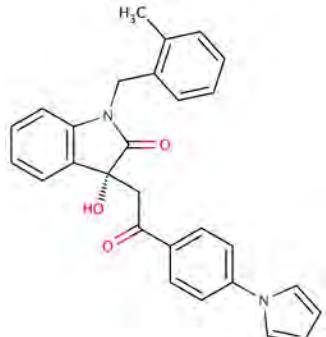
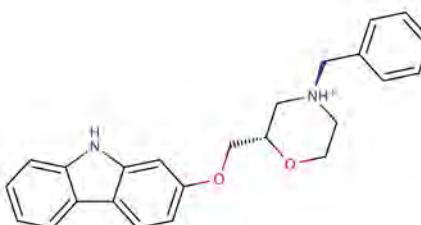
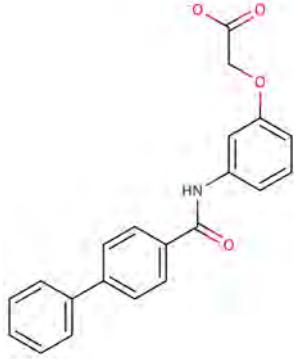
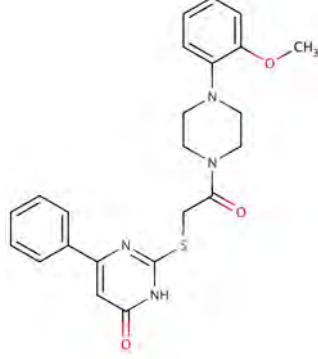
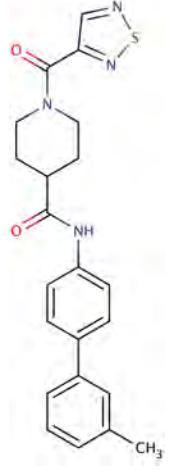
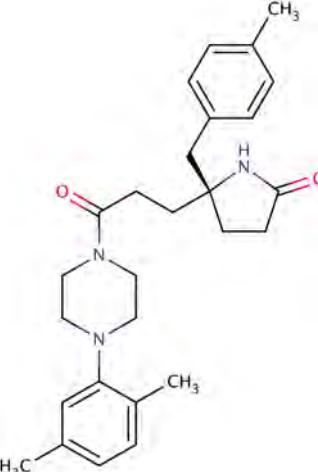
**Slika 16:** Graf RMSD v odvisnosti od časovnih korakov pri simulaciji molekulske dinamike

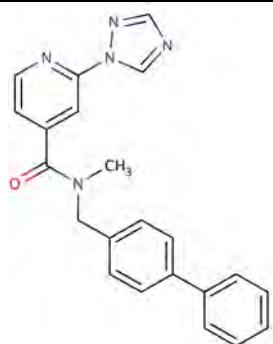
**Preglednica V:** Seznam spojin, ki smo jih poleg spojin 3 in 4 poslali na testiranje v Francijo (prikazani so struktura spojine, zaporedna številka, koda iz podatkovne baze ZINC in časovni trenutek encima, v katerega smo sidrali spojino)





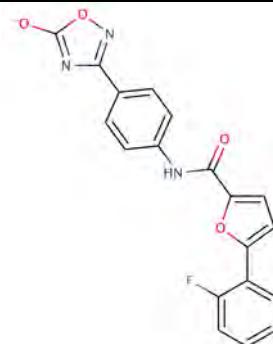
 <p><b>15</b> ZINC55211155 2100</p>	 <p><b>16</b> ZINC12449073 2100</p>
 <p><b>17</b> ZINC14184206 2100</p>	 <p><b>18</b> ZINC32478443 2100</p>
 <p><b>19</b> ZINC01124051 2199</p>	 <p><b>20</b> ZINC02349542 2199</p>

 <p><b>21</b> ZINC04123130 2199</p>	 <p><b>22</b> ZINC25638886 2199</p>
 <p><b>23</b> ZINC01064537 Kristalna struktura</p>	 <p><b>24</b> ZINC08584686 Kristalna struktura</p>
 <p><b>25</b> ZINC11761839 Kristalna struktura</p>	 <p><b>26</b> ZINC12218448 Kristalna struktura</p>

**27**

ZINC53799279

Kristalna struktura

**28**

ZINC58183368

Kristalna struktura

## LITERATURA

1. Gubina, M., Ihan A. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski Razgledi: Ljubljana, 2002; 1-16
2. Esko, J.D., Doering, T.L., Raetz, C.R. Eubacteria and Archaea. In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1945/>
3. Swoboda, J.G., Campbell, J., Meredith, T.C., Walker, S. Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 2010 Jan 4;11(1):35–45.
4. Xia, G., Kohler, T., Peschel, A. The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol Ijmm.* 2010 Feb;300(2-3):148–54.
5. Samuel, G., Reeves, P. Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr Res.* 2003 Nov 14;338(23):2503–19.
6. Kumar, A.S., Mody, K., Jha, B. Bacterial exopolysaccharides--a perception. *J Basic Microbiol.* 2007 Apr;47(2):103–17.
7. Van Heijenoort, J. Assembly of the monomer unit of bacterial peptidoglycan. *Cell Mol Life Sci.* 1998 Apr;54(4):300–4.
8. Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., Mengin-Lecreux, D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *Fems Microbiol Rev.* 2008;32(2):208–33.
9. Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Fems Microbiol Rev.* 2008;32(2):168–207.
10. Vollmer, W., Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta Bba - Biomembr.* 2008 Sep;1778(9):1714–34.
11. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *Fems Microbiol Rev.* 2008;32(2):234–58.
12. Peukert, S., Sun, Y., Zhang, R., Hurley, B., Sabio, M., Shen, X., et al. Design and structure–activity relationships of potent and selective inhibitors of undecaprenyl pyrophosphate synthase (UPPS): Tetramic, tetronic acids and dihydropyridin-2-ones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008 Mar 15;18(6):1840–4.
13. Durrant, J.D., Cao, R., Gorfe, A.A., Zhu, W., Li, J., Sankovsky, A., et al. Non-Bisphosphonate Inhibitors of Isoprenoid Biosynthesis Identified via Computer-Aided Drug Design. *Chem Biol Drug Des.* 2011;78(3):323–32.

14. Chang, S.-Y., Ko, T.-P., Chen, AP.-C., Wang, AH.-J., Liang, P.-H. Substrate binding mode and reaction mechanism of undecaprenyl pyrophosphate synthase deduced from crystallographic studies. *Protein Sci.* 2004;13(4):971–8.
15. Zhu, W., Zhang, Y., Sinko, W., Hensler, M.E., Olson, J., Molohon, K.J., et al. Antibacterial drug leads targeting isoprenoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2013 Jan 2;110(1):123–8.
16. Sun, H. Pharmacophore-Based Virtual Screening. *Curr Med Chem.* 2008 Apr;15(10):1018–24.
17. Guido, R.V., Oliva, G., Andricopulo, A.D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. *Curr Med Chem.* 2008;15(1):37–46.
18. Vyas, V., Jain, A., Jain, A., Gupta, A. Virtual Screening: A Fast Tool for Drug Design. *Sci Pharm.* 2008;76:333–60.
19. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar 1;46(1–3):3–26.
20. Miller, M.A. Chemical database techniques in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(3):220–7.
21. Schneider, G. Molecular design: concepts and applications. Weinheim: Wiley-VCH; 2008; 22
22. 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 Avgust;53(15):5707–15.
23. Splošne informacije o programu ROCS, OpenEye <http://www.eyesopen.com/rocs> Dostopano: september 2013
24. Mason, J.S., Good, A.C., Martin, E.J. 3-D Pharmacophores in Drug Discovery. *Curr Pharm Des.* 2001 May;7(7):567–97.
25. Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Nov 1;3(11):935–49.
26. Günther, J., Bergner, A., Hendlich, M., Klebe, G. Utilising Structural Knowledge in Drug Design Strategies: Applications Using Relibase. *J Mol Biol.* 2003 Feb 14;326(2):621–36.
27. Durrant, J.D., McCammon, J.A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *Bmc Biol.* 2011 Oct 28;9(1):71.
28. Splošne informacije o programu FRED <http://www.eyesopen.com/docs/oedocking/current/html/fred.html#fred> Dostopano: september, oktober 2013

29. Bento, A.P., Gaulton, A., Hersey, A., Bellis, L.J., Chambers, J., Davies, M., et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Nov 7;
30. Gaulton, A., Bellis, L.J., Bento, A.P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res.* 2011 Sep 23
31. O'Boyle, N.M., Banck, M., James, C.A., Morley, C., Vandermeersch, T., Hutchison G.R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminformatics.* 2011 Oct 7;3(1):33.
32. Ojima, I. *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology.* John Wiley & Sons; 2009.
33. Reddy, I.K., Mehvar, R. *Chirality in Drug Design and Development.* CRC Press; 2004: 139 - 190
34. Zhang, Y., Fu-Yang, Lin, Li, K., Zhu, W., Liu, Y.-L., Cao, R., et al. HIV-1 Integrase Inhibitor-Inspired Antibacterials Targeting Isoprenoid Biosynthesis. *Acs Med Chem Lett.* 2012 Apr 3;3(5):402–406.