

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KUNC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KLARA KUNC

ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV HISTONSKE DEACETILAZE Z VIRTUALNIM
REŠETANJEM

DISCOVERY OF NOVEL HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS USING VIRTUAL
SCREENING

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Ilaša.

Klara Kunc

Ljubljana, 2015

KAZALO

POVZETEK	
ABSTRACT	
KLJUČNE BESEDE	
SEZNAM OKRAJŠAV.....	
1. UVOD	<u>1</u>
1.1. Epigenetika.....	<u>1</u>
1.2. Iskanje novih zdravilnih učinkovin	<u>11</u>
2. Načrt za delo.....	<u>16</u>
3. Metode in materiali	<u>17</u>
4. Postopek dela.....	<u>19</u>
4.1 Priprava knjižnice spojin.....	<u>19</u>
4.2 Virtualno rešetanje	<u>20</u>
4.3 Testiranje z encimskim testom.....	<u>24</u>
5. Rezultati in razprava.....	<u>25</u>
<i>Sklep</i>	<u>30</u>
<i>Literatura</i>	<u>31</u>
<i>Priloge</i>	<u>33</u>

POVZETEK

Dandanes je epigenetika precej raziskovano znanstveno področje. Ukvarya se s proučevanjem sprememb v izražanju genov, ki niso zapisane v zaporedju DNK, pa se kljub temu dedujejo na potomce. Gre za različne modifikacije DNK in za spremembe strukture in funkcije kromatina. Glavni modifikaciji sta metilacija DNK in acetilacija stranske verige lizina v histonih.

Zdravilne učinkovine, ki izkazujejo inhibicijo procesa deacetilacije, zaviralce encima histonske deacetilaze (HDAC), lahko uporabljam v terapiji določenih rakavih, kardiovaskularnih, metabolnih in nevroloških bolezni. Trenutno so kot zaviralci HDAC registrirane štiri zdravilne učinkovine; vorinostat, romidepsin, hidamid in panobinostat, še nekaj pa jih je v kliničnih preizkušanjih.

V magistrskem delu smo se usmerili v iskanje novih potencialnih zaviralcev procesa deacetilacije – zaviralcev encima histonske deacetilaze.

Preiskovane spojine smo črpali iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo. Spojine smo s programom AutoDock sidrali v tarčni encim histonsko deacetilazo - HDAC2. Na podlagi izračunanih vezavnih energij smo izbrali spojine, ki naj bi imele najboljšo vezavo. Te so imele največjo negativno vrednost energije vezave, kot posledico močnih interakcij med funkcionalnimi skupinami spojin in deli encima, ki so pomembni za vezavo. Pri registriranih učinkovinah so predvsem ključne vezi hidroksamske ali benzamidne skupine s Zn²⁺ ionom aktivnega mesta in interakcije alkilne verige spojine s hidrofobnim žepom encima. Želeli smo odkriti potencialne nove strukturne elemente ugodne za vezavo.

Spojine, ki so se izkazale pri virtualnem rešetanju, smo nato testirali s komercialno dostopnim encimskim testom. Testirali smo aktivnost spojin na zmes različnih encimov HDAC. S fluorescenčno spektrofotometrijo smo pomerili odzive, kar nam je dalo podatek o aktivnosti spojin, to je delež inhibicije HDAC. Njihovo aktivnost smo primerjali z dvema kontrolama, pozitivno kontrolo, ki ni izkazovala inhibicije, in s kontrolno spojino trihostatinom A, ki je močan inhibitor HDAC.

Žal nismo uspeli dobiti spojine, ki bi jo lahko okarakterizirali kot dober inhibitor HDAC, saj so se vsi prvotni zadetki, po nadalnjem preverjanju, izkazali za lažno pozitivne. Razlog za neuspešno iskanje spojin vodnic je najverjetneje v premajhnem številu spojin v izvorni knjižnici.

ABSTRACT

Nowadays, epigenetics is an intensely explored scientific field. It deals with the study of changes in gene expression which are not contained in the DNA sequence, but nevertheless inherited to descendants. These changes are various modifications of DNA or changes of structure and function of chromatin. The main modifications are DNA methylation and deacetylation of lysine side chain in histones.

Drugs which inhibit the process of deacetylation are histone deacetylase inhibitors (HDAC). They may be used in the treatment of various cancers, cardiovascular, metabolic and neurological diseases. Four active substances registered so far are - vorinostat, romidepsin, chidamide and panobinostat, some other are in clinical trials.

In the thesis, we focused on the discovery of new potential inhibitors of the process of deacetylation – histone deacetylase inhibitors.

The investigated compounds were from library of compounds of the Faculty of Pharmacy. Using AutoDock program we docked compounds in the target enzyme HDAC2. On the basis of calculated binding energies, we choose compounds, that had the highest negative value of binding energy as a result of the strong interaction of the compound and parts of the enzyme that are important for binding. Regarding registered drugs, especially important binding interactions are between hydroxamic or benzamide group and Zn²⁺ ion of the active center and the interaction of the alkyl chain of the compound with a hydrophobic pocket of enzyme. In our work, we tried to find possible new structural elements suitable for binding.

Compounds, which gave good results using virtual screening, were than tested by commercially available enzyme assay kit. We tested the activity of compounds on the mixture of various HDAC enzymes. The response was measured by fluorescence, which gave us information of compound activity - the inhibition of HDAC. The activity was compared with two controls, a positive control without an inhibitor and control compound Trichostatine A, a potent inhibitor of HDAC.

Unfortunately, we were unable to obtain compounds that could be characterized as good HDAC inhibitors. All the original hits, after further verifications, proved to be false-positive results. The reason is probably in too small number of compounds in the source library.

KLJUČNE BESEDE:***KEYWORDS:***

- **epigenetika,** - *epigenetics,*
- **histonska deacetilaza,** - *histone deacetylase,*
- **iskanje novih spojin,** - *drug discovery process,*
- **virtualno rešetanje.** - *virtual screening.*

SEZNAM OKRAJŠAV

- 1D, 2D in 3D – enodimenzionalno, dvodimenzionalno in trodimenzionalno
- ADME – lastnosti zdravilne učinkovine, ki se nanašajo na absorpcijo, distribucijo (porazdelitev), metabolizem in eliminacijo (izločanje)
- ADP – adenozin difosfat, spojina ki nastaja v človeškem telesu in sodeluje pri nastajanju in prenosu energije, potrebne za biokemijske reakcije
- AML – akutna mieloidna levkemija
- APL – akutna promielocitna levkemija
- Asp – aminokislina asparagin
- CpG – to so področja v DNK zaporedju, kjer fosfatna skupina povezuje nukleotida citozin in gvanin
- dim-5 – gen, ki kodira zapis za histonsko metiltransferazo
- DMSO – dimetilsulfoksid, vrsta topila
- DNMT – encim DNK metiltransferaza
- dsRNK – dvovijačna molekula ribonukleinske kisline
- FDA – *Food and Drug Administration*, Ameriški urad za hrano in zdravila
- GRID – predstavlja delovno polje oz. s koordinatami omejen okvir; pri virtualnem rešetjanju določa meje sidranja spojine
- H1 – histonski protein, ki ne tvori oktamera, vendar povezuje med seboj posamezne nukleosome, ovite z baznimi pari DNK
- H2A, H2B, H3 in H4 – histonski proteini, ki sestavljajo osemdelne komplekse (oktamere) nukleosomov

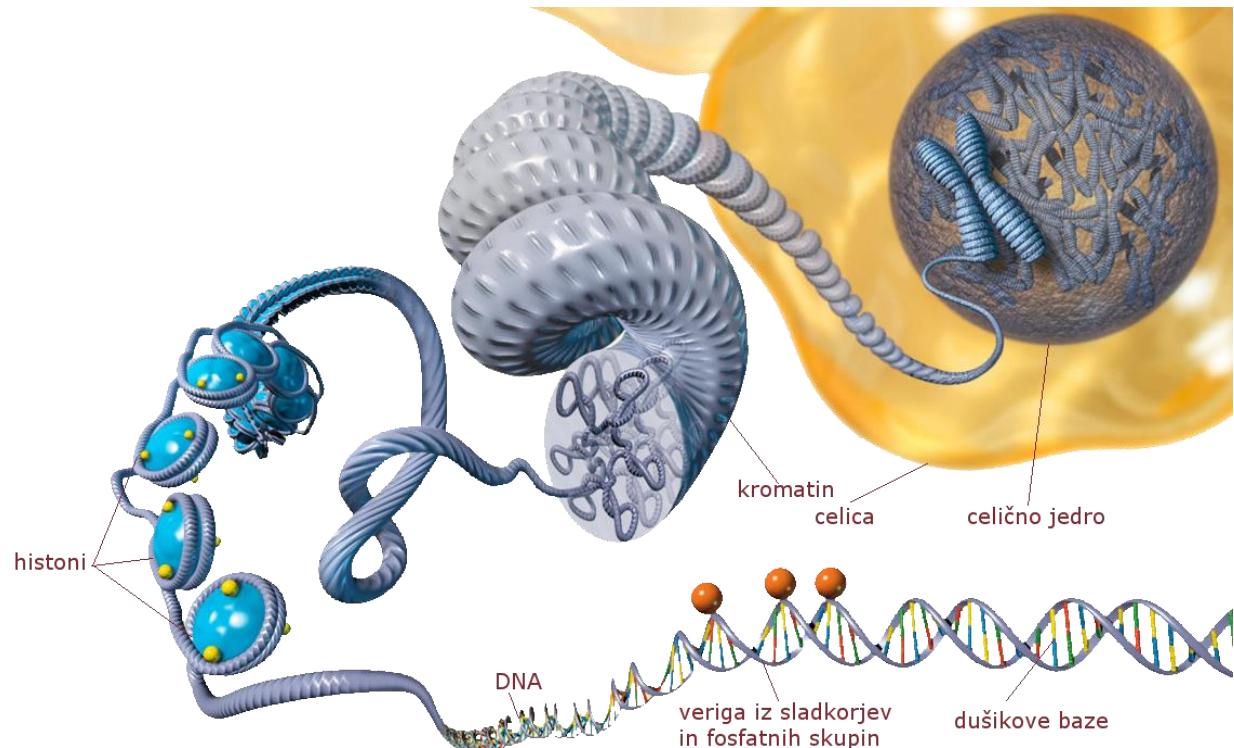
- HAT – encim histonska acetiltransferaza, ki katalizira pripenjanje acetilne skupine na histone
- HDAC – encim histonska deacetilaza, ki odstranjuje acetilno skupino s histonov
- HeLa celice – so celice iz celičnih linij, ki se uporabljajo za znanstvene raziskave. Gre za najstarejše in najpogosteje uporabljeni humane celične linije. Izvirajo iz celic raka materničnega vratu.
- HDM – encim histonska demetilaza
- HMT – encim histonska metiltransferaza
- HPLC – visokotlačna tekočinska kromatografija
- HTS – metoda rešetanja visokih zmogljivosti
- IC₅₀ – inhibitorna koncentracija; pove nam koliko zdravilne učinkovine je potrebno, da dosežemo 50% delež inhibitornega učinka neke biološke ali biokemijske funkcije.
- iRNK – interferenčna ribonukleinska kislina
- kDa – kilodalton; standardna enota za merjenje atomske mase
- Leu – aminokislina levcin
- LGA – *Lamarckian genetic algorithm*, genetski algoritem
- logP – porazdelitveni koeficient; predstavlja razmerje med koncentracijama spojine v mešanici dveh različnih nemešajočih se faz, ki sta med seboj v ravnotežju. Pove nam razliko topnosti spojine v eni ali drugi fazi.
- LOI – *loss of genomic imprinting*; predstavlja izgubo genetskega vtisnjena, ki ga povzroči metilacija DNK in ima za posledico izražanja le ene od starševskih kopij gena
- Lys – aminokislina lizin
- MeCP2 – *methylcytosine binding proteins*; to so proteini, ki se vežejo na metilirane CpG otoke in tako ustvarijo prepreko, da bi se na promotorsko zaporedje vezali transkripcijski faktorji
- Met – aminokislina metionin
- min – minuta
- M – molska masa
- MM₂ – protokol, molekulsko polje sil
- msec – milisekunda
- MW – molekulska masa

- NAD⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid
- NMR – nuklearna magnetna resonanca
- O-AADPR – *O*-acetil-ADP-riboza
- p53 – celični protitumorski protein
- Phe – aminokislina fenilalanin
- Pro – aminokislina prolin
- RASSF1 – *Ras association domain-containing protein 1*, protein
- RA% – delež rezidualne aktivnosti oz. delež inhibicije
- SAR – *Quantitative structure–activity relationship*; odnos med strukturo in delovanjem je model, ki nam pomaga pri iskanju novih zdravilnih učinkovin. Predstavlja funkcionalne skupine, ki so pomembne za aktivnost spojine.
- S-faza – faza celičnega ciklusa, znotraj katere poteka podvajanje DNK
- Sin3A – gen, ki kodira zapis za protein, ki regulira proces transkripcije.
- TET – *Ten-eleven translocation enzymes*, encim TET
- UV – ultravijolična svetloba

1. UVOD

1.1 Epigenetika

Epigenetika je znanstvena veda, ki preučuje spremembe v izražanju genov, ki niso posledica sprememb v zaporedju DNK (1). Opredelimo jo lahko kot somatsko prijeno stanje genskega izražanja, ki izhaja iz sprememb v trodimenzionalni strukturi kromatina (2) (slika 1).



Slika 1: Struktura molekule DNK

Beseda "epigenetika" se je začela pojavljati leta 1940, vendar pa njen izvor sega že okrog leta 1800 (1).

Da ima kromatin genetske lastnosti je omenil že Heitz v svoji študiji leta 1928. Z opazovanjem kromosomov pri celični delitvi je kromosom razdelil na evkromatin (razrahljan) in heterokromatin (s kompaktnim jedrom) (1). Ta razdelitev olajša razumevanje nadzora genske aktivnosti v višjih organizmih. Epigenetika naznana, da na izražanje in aktivnost genov ter prenos le teh na potomce lahko vplivajo okolje, hrana, zdravila, razvoj v maternici, pri tem pa ne pride do spremembe zaporedja DNK, temveč do dolgotrajne spremembe aktivnosti posameznih genov, ki so vključeni v procesih embrionalnega razvoja, staranja ali nastanka raka. Genski zapis lahko spremenijo naključne mutacije. Vendar se zaradi naključnosti samo z mutacijami naš organizem ne more prilagoditi na okolje, saj so te zelo počasne in omogočijo preživetje organizmov in evolucijo ter nastanek novih vrst, ne pa

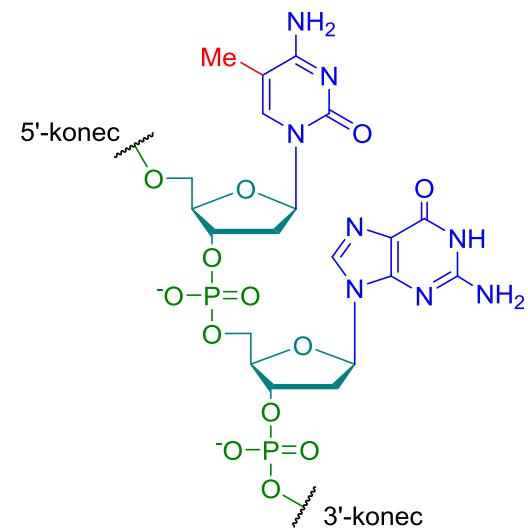
prilagajanje trenutnemu okolju. Prilagajanje trenutnemu okolju nam omogoča epigenetika. Kot smo že omenili, se epigenetika nanaša na vse, kar je povezano s kromatinom; njegovo strukturo in funkcijo (3).

Kromatin je polimerni kompleks genomske DNK, histonov in nehistonskih proteinov. Osnovne strukturne enote kromatina so nukleosomi, sestavljeni iz specifičnega osemdelnega kompleksa (oktamera), iz po dveh molekul histonskih proteinov: H2A, H2B, H3 in H4. Okrog nukleosoma pa je ovitih približno 147 baznih parov DNK. Te enote so organizirane v nizih in so povezane s povezovalcem H1, ki tudi spada med histonske proteine, vendar ne tvori oktamera (4, 1). Povezovalec H1 uravnava razmerje DNK in histonov ter njihov položaj. S tem ima vpliv na podvojevanje (replikacijo), prepisovanje (transkripcijo) in popravljanje DNK. H2A in H2B pogosto imenujemo strukturalna histona, H3 in pa H4 pa funkcionalna histona. Kromatin je odgovoren za zaščito in gensko regulacijo. Preprečuje vezavo transkripcijskih dejavnikov na dele genskega promotorja na molekuli DNK in tako regulira gensko izražanje in s tem proliferacijo, diferenciacijo ter tumorogenezo (5, 6).

Epigenetika se ukvarja z molekulami - promotorji, ki se vežejo na določen odsek jedrne DNK in z modifikacijo povzročijo ali pa zavrejo prepisovanje posameznih genov. Najprej so opazili fosforilacijo, ubikvitinacijo in ADP-ribozilacijo histonov, vendar sta najbolj obsežni in pomembni modifikaciji metilacija DNK in acetilacija histonov.

Pri metilaciji DNK se metilna skupina ali hidroksimetilna skupina s pomočjo encimov DNK metiltransferaz, kovalentno veže na citozin (na 5. ogljikov atom otočka CpG) na molekulo DNK (slika 2) pri podvojevanju dvostranske DNK (S faza celičnega cikla) v zgodnji fazi nastajanja zarodka (6, 1).

Evkariotsko DNA metiltransferazo so prvič klonirali in sekvencirali leta 1988 po zaslugi Bestorja in Ingrama. DNA metiltransferaza je razmeroma velik protein, saj meri približno 190 kDa in vsebuje približno 1620 aminokislin. Do metilacije lahko pride tudi samo v eni verigi DNK. Tako dobimo hemimetiliran dinukleotid CpG. Do metilacije pride v območju, ki ureja aktivnost nekega gena in tako prepreči translacijo v proteine in tako nastanek aktivnih



Slika 2: Metilacija citozina pri 5'-CpG-3' zaporedju DNA

proteinov. Metilcitozin je edina metilirana baza v DNK. Leta 1980 je Adrian Bird opozoril na dejstvo, da se pri živalih metilacija DNK različno izraža. Zelo slabo je izražena pri členonožcih, srednje izražena je pri nečlenonožcih in nevretenčarjih, zelo izražena pa je pri vretenčarjih. Zakaj je tako, nam še danes predstavlja uganko. Na molekulo DNK se lahko pripne ena ali več metilnih skupin. Lahko pa se zgodi, da se z določenega gena metilne skupine odstranijo in tako povečajo aktivnost gena. To se dogaja pri celični diferenciaciji in razvoju, kjer kemijski modifikatorji (rastni dejavniki, hormoni) omogočijo različnost funkcij med celicami in nastanek specializiranih tkiv. V humanem genomu je metiliranih okrog 70 % vseh otočkov CpG. Metilirani citozinski odsek se raztegne v veliki zavoj molekule DNK in s tem povzroči spremembo konformacije. Tako je onemogočena vezava transkripcijskega dejavnika na CpG. Lahko pa metilacija spremeni funkcijo MeCP2 (*methylcytosine binding proteins*), to so proteini, ki se vežejo na metilirane otočke CpG in tako ustvarijo prepreko, da bi se na promotorsko zaporedje vezali transkripcijski dejavniki. (1)

Leta 2001 sta Eric Selker in Hisashi Tamaru ugotovila, da je gen, ki kodira za histonsko metiltransferazo (dim-5), ki povzroči metilacijo lizina na histonskih repih kromatina pri glivah *Neurosporra crassa*, odgovoren za metilacijo DNK. Da histonska metilacija posledično vpliva na metilacijo DNK so dokazali, ko so v H3 lizin na mestu 9 zamenjali z argininom ali levcinom, kar je pripeljalo do izgube metilacije DNK "in vivo". Pri glivah so ugotovili, da je lizin metiliran prednostno v področjih heterokromatina. Medtem pa je Fire s sodelavci ugotovil, da je dsRNK mnogo močnejša pri utišanju genskega izražanja. Ugotovili so, da je za utišanje gena potrebno le nekaj molekul dsRNA. To RNK so poimenovali interferenčna RNK. Shiv Grewal, Robert Martiennssen in kolegi so na modelu kvasovk ugotovili, da so histonske modifikacije vodene z iRNK, ki utiša gene. Utisanje ima za posledico izgubo histona H3 in funkcijo centromere (1).

Za identifikacijo in kvantifikacijo metiliranih citozinov so uporabili občutljive in specifične instrumentalne, biokemijske in imunološke metode, kar je prineslo pomembne informacije o vzorcih metilacije DNK. Vendar pa nobena od njih sama ni opredelila porazdelitve metilacije ali poglobila razumevanja njene funkcije. Danes za ta namen uporablajo različne kromatografske metode (tankoplastno, tekočinsko kromatografijo HPLC), kapilarno gelsko elektroforezo, imunološke metode, fluorescenčno spektroskopijo, mikromreže, bisulfitno sekvenciranje, različne restrikcijske analize... (14). Metilacijo DNK ugotavljamo na 5'-koncih v promotorski regiji določenega gena, ki je bogata z mesti CpG (predstavljajo 56-odstotni delež v področju promotorja). Normalno so ta področja v celicah nemetilirana. Razen v genih,

ki nosijo zapis za kromosom X in v področjih transpozonov. Tako kot genetske mutacije je tudi epigenetika odvisna od naravnega izbora in ni prisotna nujno pri vseh osebkih. Spremembe DNK se lahko z mitozo prenašajo iz roda v rod, vendar pa se lahko tudi odstranijo iz genoma in privedejo v prvotno stanje.

Epigenetika je prisotna tudi pri nastanku določenih bolezni, kot so rak, kardiovaskularne bolezni, metabolne bolezni, avtoimunske bolezni, vnetni procesi, debelost, inzulinska rezistenca, nevrodegenerativne bolezni in pri delovanju možganov. Pri boleznih se lahko avtosomno dominantno deduje hipermetilacijski profil. Pri rakavih bolnikih bi tako služila epigenetska terapija, s katero bi aktivirali epigenetsko utišane gene, kar bi predstavljalo manjšo škodljivost v primerjavi s citostatično kemoterapijo. Hipermetilacija utiša tumorsupresorske in druge gene, ki so odgovorni za nastanek raka. Poleg hipometilacije in hipermetilacije so pri rakavih boleznih ugotovili tudi spremembo LOI (*loss of genomic imprinting* - predstavlja izgubo genetskega vtisnjena), kar vodi do aktivacije genov, ki so odgovorni za pospešeno rast (inzulinu podoben rastni dejavnik 2) in utišanje genov, ki rast zavirajo (tumor supresorski gen). Z rakom je povezana tudi metilacija kodonov pri genu p53. Te danes uporabljamo kot epigenetske označevalce za detekcijo malignih sprememb – obsežnih hipometilacij otočkov CpG (1).

V eni zgodnjih študij so izvedli terapijo različnih celičnih linij z zavircem metilacije 5-azacitidinom. Terapija je pokazala aktivacijo velikega števila genov. Kasneje so ugotovili, da vključitev citidinskih analogov v molekulo DNK vodi do kovalentne ujetosti encima 5-metiltransferaze, s čimer se zmanjša encimska aktivnost in s tem pride do demetilacije in reaktivacije z njo povezanega gena.

Za namen zdravljenja rakavih in nevroloških bolezni poteka razvoj inhibitorjev DNK metiltransferaz (demetilatorjev). Posledica njihove vgradnje v novonastalo verigo DNK je izguba aktivnosti DNK metiltransferaze. Demetilatorje uporabljamo pri hematoloških in mieloidnih boleznih - mielodisplastičnem sindromu. Terapevtski učinek je predvsem hipometilacija promotorja gena, ki je bistvenega pomena za diferenciacijo ter neposredni citotoksični učinek na hematopoetske celice v kostnem mozgu, ki so izgubile kontrolo nad celičnim ciklusom in tako povzročile dražljaje, ki so sprožili signale za rast (1, 6).

Zgodnje odkrivanje epigenetskih sprememb v navidez zdravem tkivu bi lahko napovedalo nagnjenost k razvoju bolezni. Torej bi epigenetsko analizo lahko uporabljali v diagnostične namene. Cilj takšne analize je mapirati metilirane otočke v molekuli DNK. Želeli so tudi opredeliti epigenomske označevalce v posameznih človeških tkivih, v različnih fazah razvoja

bolezni. Povezava med spremembami histonov in nekaterimi oblikami duševnih bolezni je že uveljavljena in služi za prenatalno analizo, s katero odkrijemo mutacije v določenih proteinih in encimih, ki so odgovorni za delovanje kromatina. Bolezni, katerih etimologija so epigenetske spremembe, sta Angelmanov sindrom in Prader-Vilijev sindrom. V zadnjih letih so uvedli nov pojem epigenetski karcinogeni, pod katere uvrščamo arzen, nikljeve zlitine in nekatere oblike benzenovih derivatov. Ni nujno, da so direktno mutageni, vendar pa imajo za posledico povečano pogostost epigenetskih sprememb in posledično tumorjev.

Povečana metilacija DNK je povezana tudi s shizofrenijo, odvisnostjo od alkohola in samomorilskimi nagnjenji (1).

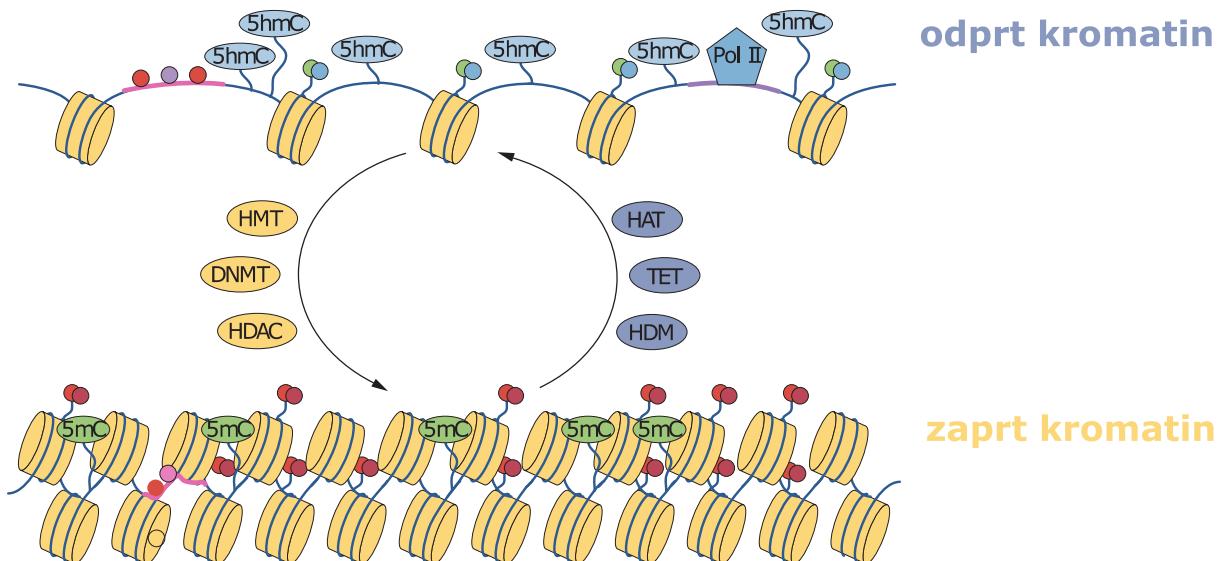
Epigenetska odkritja lahko vplivajo na to, kako oblikovati zdravila, na način tarčnega delovanja in na raven terapevtskega odmerka. Poleg tega lahko vplivajo na oblikovanje psihosocialne terapije. Vse to ni pomembno samo za zdravljenje psihiatričnih motenj, ampak tudi za njihovo preprečevanje in zagotavljanje terapevtske koristi na populacijski in individualni ravni (7).

Do epigenetskih sprememb pa lahko poleg metilacije DNK privede tudi utišanje genov, ki so odvisni od molekul RNK in posttranslacijske modifikacije kromatina preko histonskih oznak. Te posttranslacijske modifikacije so večinoma kovalentne in do njih prihaja znotraj histonskih beljakovin v nestabilnih aminokislinskih delih, ki jim pravimo N-konci histonskih repov, kar povzroči spremembe v obsegu ovijanja DNK okrog histonov in sposobnost aktivacije genov. pride lahko do acetilacije, metilacije, fosforilacije, ubikvitinacije in sumoilacije (8).

1.1.1 HDAC

Acetilacijo aminske skupine lizina znotraj histonov regulirata dve skupini encimov: HAT – histonske acetiltransferaze, ki katalizirajo pripenjanje acetilne skupine na histone ter omogočajo odpiranje kromatina in gensko izražanje, in HDAC - histonske deacetilaze, ki odstranjujejo acetilno skupino iz histonskih repov in utišajo gene.

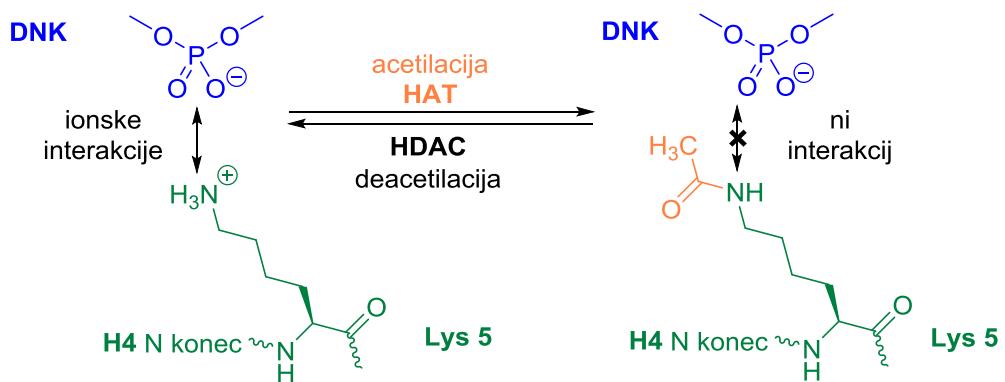
Metilacija DNK je vzročno povezana s transkripcijskim utišanjem genov in spremembo kromatina. Histonska acetilacija je povezana z odprto konformacijo kromatina, ki omogoča gensko prepisovanje, medtem ko histonska deacetilacija ohranja kromatin zaprt (heterokromatin) (slika 3) (8).



Slika 3: Encimi HDAC ob sodelovanju z drugimi encimi (DNMT – DNK metiltransferaza in HMT - histonska metiltransferaza) privedejo do zaprte konformacije kromatina. S tem kromatin inaktivirajo in onemogočijo izražanje genov. Encimi HAT – histonska acetiltransferaza, TET encim (*ten-eleven translocation*) in HDM – histonska demetylaza pa kromatin aktivirajo in omogočijo gensko izražanje. *Pol II* - RNK polimeraza II; *5hmC* - 5-hidroksimetilcitozin; *5mC*, 5-metilcitozin.

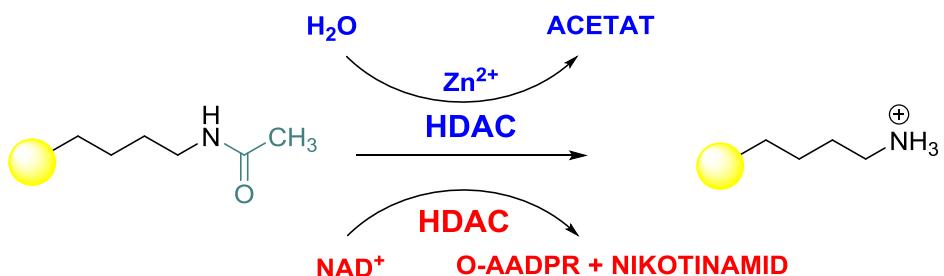
HDAC hkrati vplivajo na stopnjo metiliranja promotorjev genov. Deacetilacija histona je povezana z aktivacijo DNK-metiltransferaz, ki nato privedejo do lokalnih hipermetilacij molekule DNK v področju promotorja. Te spremembe so irreverzibilne. Če je regulacija porušena, se to lahko odraža s pojavom različnih bolezni, kot so rakave bolezni, kardiovaskularne bolezni, vnetja, metabolne motnje in nevrološke bolezni (8).

Deacetilacija deluje na dva načina: deacetilira se aminokislina lizin, kar omogoči večje ionske interakcije med pozitivno nabitimi skupinami N-končnih histonskih repov in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami molekule DNK. To pa privede do vezave transkripcijskih dejavnikov na specifična zaporedja DNK (slika 4) (9). Lahko pa deacetilacija povzroči interakcije med sosednjimi nukleosomi, kar privede do zgostitve kromatina.



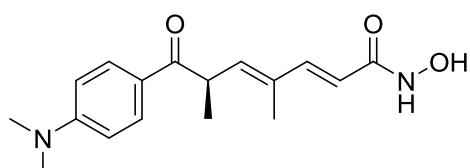
Slika 4: Acetilacija in deacetilacija povzročita ali preprečita ionske interakcije med pozitivno nabitimi skupinami N-končnih histonskih repov in negativno nabitimi fosfatnimi skupinami DNK molekule.

Poznamo 18 encimov HDAC v človeškem genomu, te pa lahko razdelimo v dva večja razreda. En razred predstavlja od Zn^{2+} odvisne HDAC, drugi razred pa od NAD^+ odvisne HDAC (slika 5). Nadalje encime HDAC razdelimo v različne razrede, glede na njihovo funkcijo.



Slika 5: Potek deacetilacije s HDAC, ki so odvisne od Zn^{2+} (zgoraj) in potek deacetilacije s HDAC, ki so odvisne od NAD^+ (spodaj).

Leta 1998 so ugotovili, da se HDAC in MeCP2 pojavljata skupaj v kompleksu. Kompleks vsebuje tudi korepresor Sin3A, ki je odgovoren za utišanje deacetilacije in več dodatnih neznanih proteinov. Hkrati so ugotovili, da se utišanje transkripcije povrne po dodatku trihostatina A - specifičnega inhibitorja HDAC (1) (slika 6).



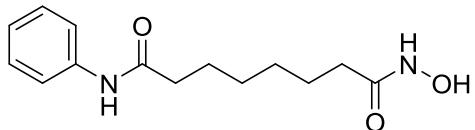
Slika 6: Trihostatin A

Cameron je ugotovil, da trihostatin A sam ne aktivira hipermetiliranih genov, vendar omogoči ponovno aktivacijo nemetiliranih genov. Te ugotovitve prikazujejo, da imajo dominantnejšo vlogo pri genski represiji gosto metilirani otočki CpG in ne histonska deacetilacija. Rezultati

so pokazali, da histonska deacetilacija ni potrebna za vzdrževanje utišanja genov, vendar pa ima vlogo pri utišanju, ko je raven DNK metilacije zmanjšana (1).

Uvedba inhibitorjev HDAC v terapijo je smiselna, saj je čezmerna aktivnost HDAC pri rakavih celicah znanstveno dokazana v številnih primerih. Inhibitorji HDAC blokirajo celični cikel in inducirajo apoptozo. Izbira inhibitorjev HDAC je odvisna od želenih kinetičnih lastnosti delovanja. Inhibitorji z benzamidno skupino imajo, za razliko od spojin, ki vsebujejo hidroksamsko skupino (trihostatin A), počasno kinetiko vezave, se tesno vežejo na tarčo in dolgo delujejo. Trihostatin A tako izkazuje hitro vezavo na tarčo in kratkotrajno delovanje.

Inhibira izobliki HDAC1 in HDAC2. Poleg tega je tudi močan inhibitor HDAC3. Struktura vorinostata v kompleksu s HDAC2 je prva struktura hidroksamskega inhibitorja s tem izoencimom (slika 7).



Slika 7: Vorinostat

Pri izbiri inhibitorjev je pomembna tudi selektivnost delovanja. V eni izmed študij so ugotovili, da boljšo selektivnost izkazujejo benzamidi. Ti izkazujejo izoencimsko selektivnost predvsem na HDAC, ki so odvisne od Zn^{2+} . Pri vseh inhibitorjih hidroksamska in benzamidna skupina kompleksirata Zn^{2+} v trigonalni bipiramidni obliki, z amidno in karbonilno skupino. Alkilna veriga se veže v ozek lipofilni žep encima, podobno kot ostanek stranske verige aminokisline lizin (8). Polarni del gleda ven iz lipofilnega žepa. Benzamidi tvorijo s fenilnim obročem hidrofobne interakcije s Phe155 in Pro34. Amidni dušik tvori polarne interakcije z Asp104. Encim vsebuje dodatni žep, tako imenovani "foot pocket", v katerega se vežejo stranske verige spojin (interakcija s tiofenom). Žep nastane po konformacijski spremembi aminokislin Leu144 in Met35. Pomemben je za tvorbo dodatnih H-vezi z ligandom in omogoča počasno kinetiko in dolgotrajno delovanje benzamidnih inhibitorjev. Ko pride do kompleksacije Zn^{2+} , je ligand tesno ujet v encim in dolgo deluje. Pri hidroksamskih inhibitorjih pa se na Zn^{2+} veže hidroksamska skupina in odstrani se vezana voda. Farmakokinetika takih inhibitorjev je bolj enostavna in hitra (8).

Učinkov in delovanja inhibitorjev HDAC še ne poznamo dovolj dobro. Vemo pa, da kinetična hitrostna konstanta inhibitorjev HDAC korelira s celično histonsko acetilacijo in da imajo inhibitorji HDAC, glede na svoje farmakološke lastnosti, različen vpliv na celično aktivnost (8).

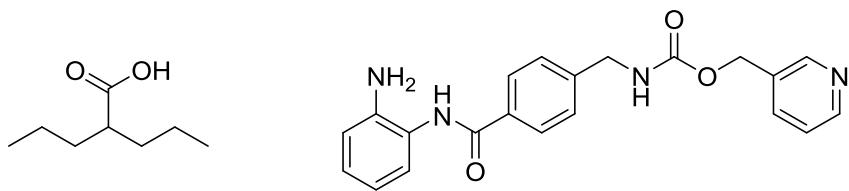
Spremembe histona so potrebne za natančno regulacijo genskega izražanja. V številnih študijah poskušajo na poskusnih modelih najti povezavo med temi spremembami in fenotipom. Trenutne raziskave prikazujejo povezavo acetilacije histonov H3 in H4 z

izboljšano sposobnostjo učenja in pomnjenja. Ker je kromatin bistvenega pomena za učinkovito popravljanje napak v DNK in histonih, lahko te spremembe privedejo do neželenega in bolezenskega izida. Nedavne študije so pokazale vpletjenost motenj acetilacije histonov pri nevrodegenerativnih boleznih staranja, kot so amiotrofična lateralna skleroza, Alzheimerjeva bolezen in shizofrenija. Pri bolnikih z amiotrofično lateralno sklerozo so opazili povišano raven HDAC2 v hrbtenjači, pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo pa v hrbtenjači in hipokampusu. Po smrti bolnikov z depresijo pa so našli zmanjšano koncentracijo HDAC2 v *nucleus accumbens*. Inhibitorje HDAC lahko tako uporabljam tudi za zdravljenje kroničnih nevroloških bolezni (1).

Akutna promielocitna/mieloidna levkemija je odličen model, ki prikazuje modulacijo genske transkripcije kot posledico acetilacije in terapevtski potencial inhibitorjev HDAC. Akutna promielocitna levkemija (APL) je hematopoetski rak, ki vključuje gen za receptorje za retinojsko kislino alfa. V odsotnosti liganda povzroči HDAC (s pomočjo Sin3) kondenzacijo kromatina, kar preprečuje vezavo transkripcijskih dejavnikov na gen. Za zdravljenje uporabljam inhibitor HDAC - natrijev butirat. Natrijev fenilbutirat pa uporabljam za zdravljenje beta talasemije, AML in raka prostate. Suberoilanilid hidroksamsko kislino uporabljam za zdravljenje raka na mehurju (8).

Največji problem inhibitorjev HDAC je njihova neselektivnost. Acetiliranje je temeljni biološki proces in uporaba teh zdravil ima gotovo vpliv na vse signalne poti, ki jih ureja acetilacija. Pravi molekulski mehanizem pri zdravljenju ostane skrit. Ne vemo, ali je rezultat posledica inhibicije HDAC ali je naključen zaradi "stranskih učinkov" po učinkih širokospektralnega zdravila. Glede na potencialne prednosti uporabe inhibitorjev HDAC so ugotovili, da s povečano izoencimsko selektivnostjo in večjo močjo povzročijo manj neželenih učinkov, ki nastanejo zaradi zaviranja neustreznih izooblik encimov HDAC. Zato so se usmerili v iskanje inhibitorjev HDAC (po strukturi benzamidnih) z boljšo izoencimsko selektivnostjo (6).

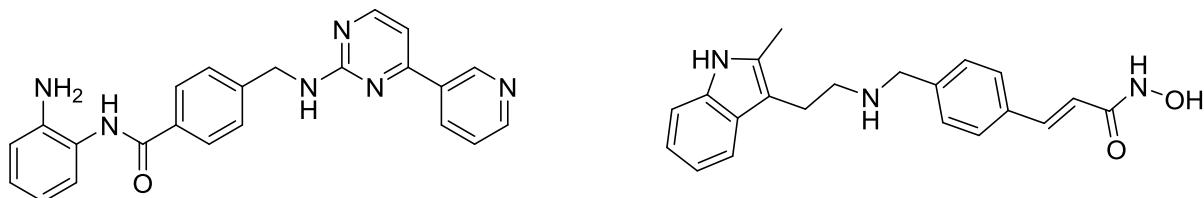
Nekatere inhibitorje, kot so vorinostat, valprokska kislina in entinostat (slika 8) so testirali v kliničnih študijah in jih je FDA že odobrila kot zdravila (vorinostat oktobra 2006) in jih uporabljam predvsem za zdravljenje kožnih manifestacij T-celičnega limfoma pri bolnikih s progresivno, stalno ali ponavljajočo se boleznijo (8).



Slika 8: Valprojska kislina (levo) in entinostat (desno)

Delovanje encimov HDAC je povezano s karcinomom prostate ali hipertrofijo prostate. Ob utišanju tumorsupresorskega gena RASSF1 zaradi povečanja metilacije, so ugotovili zmanjšanost malignih tumorjev prostate (6). Na nemetiliranih promotorjih so bile na histonih aminokisline lizina acetilirane in dimetilirane (H3K4). Z uporabo inhibitorjev metilacije DNK, vendar ne inhibitorjev HDAC, je prišlo do sprememb v modifikaciji histonov, povezanih s promotorjem (6). Komunikacija med acetilacijo histona in metilacijo DNK je tako pokazala ključno vlogo pri funkciji celic.

Jasno je torej, da je selektivnost delovanja eden od najpomembnejših ciljev epigenetskih zdravil. Trenutno je v kliničnem preizkušanju spojina mocetinostat (slika 10), ki je močan in selektiven zaviralec HDAC1. Nedavno so objavili protitumorno aktivnost tega zdravila "in vitro" in "in vivo". Poleg tega obstaja nekaj študij, katerih rezultati kažejo, da bi lahko bila uporaba inhibitorjev HDAC uspešna za zdravljenje Hodgkinovega limfoma, akutne mieloične levkemije in mielodisplastičnega sindroma (6). Učinkovina panobinostat (slika 9) se je izkazala za zelo uspešno pri spodbujanju aktivnosti genov, odgovornih za popravljanje poškodb DNK in apoptozo celic pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo.



Slika 9: Učinkovini mocetinostat (levo) in panobinostat (desno)

Epigenomski pristop dejansko pomeni novo in boljšo prihodnost na področju zdravljenja raka. Tu gre za mehanizme, ki so odgovorni za spremicanje genske aktivnosti znotraj nekega časovnega okna, ki še vedno omogoča povratek na prvotno stanje. To nam da vedeti, da gremo z razvojem v pravo smer (6, 10, 11, 12).

1.2 Iskanje novih zdravilnih učinkovin

1.2.1 Knjižnice spojin

Kemijske knjižnice so različno velike zbirke spojin, od nekaj sto spojin do nekaj sto tisoč spojin. Pripravimo jih lahko s klasično sintezo ali s kombinatorno sintezo (bolj uporabna za pripravo večjega števila spojin). Manj razširjene so knjižnice spojin naravnega izvora, saj so naravne spojine po kemijski strukturi bolj kompleksne in težje dostopne v večjih količinah. Izolacije naravnih spojin zahtevajo kompleksne ekstrakcije, separacije, izolacije, identifikacije in karakterizacije posameznih spojin. V primeru rešetanja ekstraktov naravnih spojin (zmesi), pa predstavlja težavo dejstvo, da prihaja do sinergističnih učinkov različnih spojin prisotnih v ekstraktih, značilna je težavna in nenatančna identifikacija, poleg tega pa tudi težko biološko ovrednotimo spojine, ki so pravzaprav odgovorne za aktivnost. Vendar pa so spojine naravnega izvora zelo zanimive, saj so pomemben vir novih strukturnih razredov spojin. Nove kemijske razrede spojin je danes že težavno najti. Prav tako pa je težko najti dostopne knjižnice z okarakteriziranimi in biološko testiranimi naravnimi spojinami (13).

1.2.1.1 Kemijski intermediati

Kemijski intermediati so spojine, ki služijo pripravi potencialnih zdravilnih učinkovin. Kemijski intermediati so po kemijski strukturi povezani s končnimi spojinami, saj imajo skupne strukturne lastnosti, ni pa nujno izključeno, da imajo tudi skupne farmakološke lastnosti. Iz tega razloga je pametno, da spojine testiramo tudi na njihovo farmakološko aktivnost. Zaradi majhne molekulske mase so kemijski intermediati zelo pomembni pri načrtovanju novih spojin na osnovi fragmentov (14).

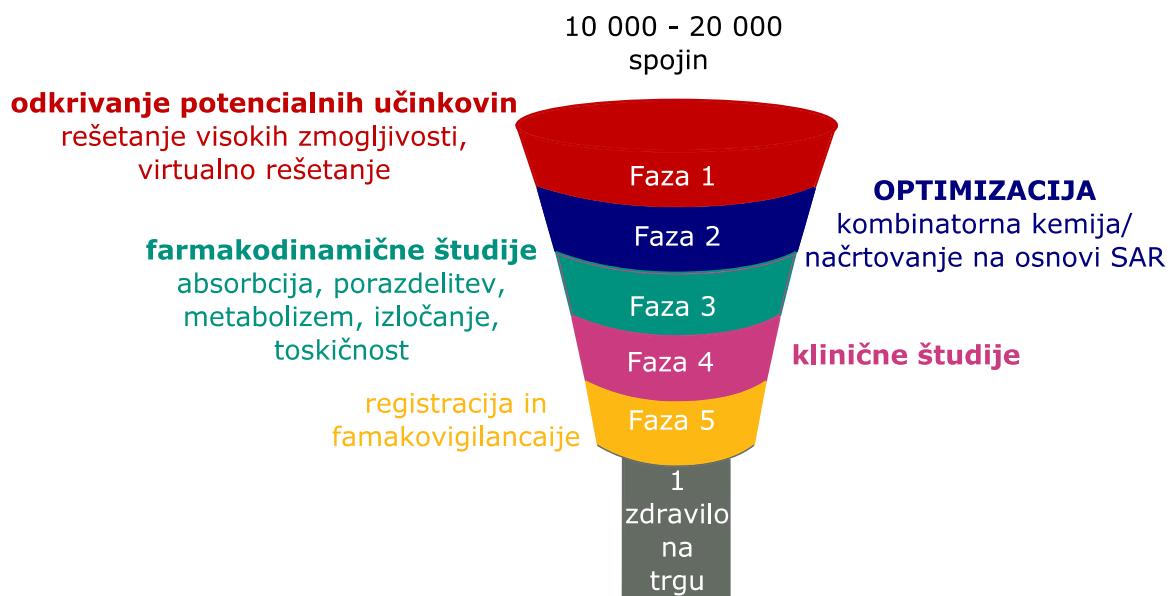
1.2.1.2 Fokusirane knjižnice

S poznavanjem tarče in željo po odkritju spojin z delovanjem na to točno določeno tarčo filtriramo knjižnico spojin. Tako dobimo fokusirano knjižnico spojin, ki vsebuje spojine, za katere je večja verjetnost, da bodo tudi v praksi aktivne. Knjižnico tako skrčimo, a hkrati obogatimo. S poznavanjem osnovnih farmakoformnih zahtev lahko spojino nadalje optimiziramo. Z optimizacijo aktivne spojine dosežemo boljše fizikalno-kemijske, farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti spojine. Na primer, izberemo le spojine, ki so rahlo bazične, izločimo pa vse nevtralne in kisle spojine (15).

1.2.1.3 Iskanje novih učinkovin

Nekdaj so bile kot vir zdravilnih učinkovin najpomembnejše spojine naravnega izvora. Kasneje pa so vse bolj posegali k iskanju spojin, ki bi jih sintezno pripravljali v laboratoriju, vendar je danes že precej težko priti do novih strukturno raznovrstnih zdravilnih učinkovin. Zato se raziskovalci ponovno vračajo k raziskovanju spojin naravnega izvora (13).

Do približno leta 1980 so bile informacije o tarčah, na katere delujejo zdravila na molekulski ravni nezadostne. Odkrivanje novih zdravil je bilo predvsem posledica podatkov, pridobljenih iz testiranj na farmakoloških modelih relativno majhnega števila spojin (14). Zdravila na tržišču so večinoma izvirala iz spojin vodnic naravnega izvora. Nekdaj je bilo učinkovin, ki so jih odkrili s pomočjo rešetanja, zelo malo, saj je bilo rešetanje slabo zmogljiv, ročen in zahteven proces. Proces je lahko opravil s 100 spojinami na teden. Kasneje pa so spojine odkrivali na osnovi tarče, kar je omogočil napredek v molekularni biologiji, avtomatizaciji, kombinatorni kemiji in informatiki. Napredek v molekularni biologiji je povečal dostop do številnih tarč delovanja učinkovin in omogočil njihovo uporabo v molekularnih in celičnih testih. Z izboljšano avtomatizacijo smo dobili orodja za rešetanje večjih knjižnic, poleg tega pa zmožnost zbiranja in interpretacije velikih količin dobljenih podatkov (14). Pogosto uporabljamo računalniško podprtvo iskanje novih zdravilnih učinkovin, ki ga imenujemo metoda rešetanja visokih zmogljivosti (HTS) (15) (Slika 10).



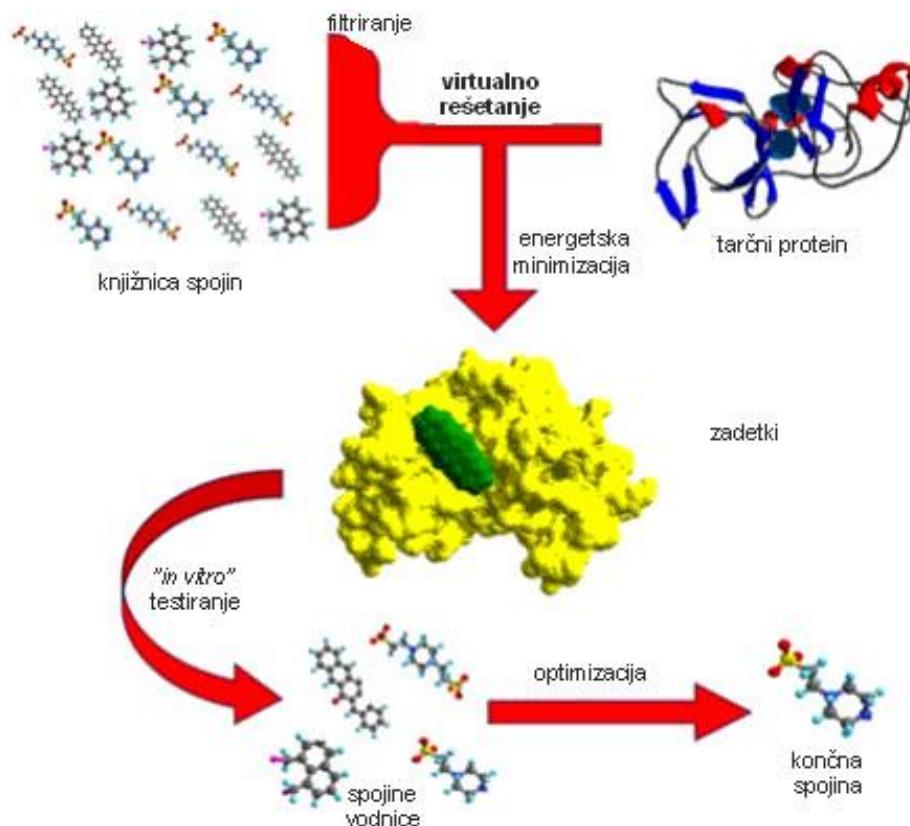
Slika 10: Proses odkrivanja novih zdravilnih učinkovin, ki mu sledi razvoj novega zdravila, procesi registracije zdravila ter sprostitev zdravila na tržišče.

Rešetanje poteka avtomatizirano, robotizirano v "in vitro" testih. Količine spojin, ki jih potrebujemo, so zelo majhne (v mikro- ali submikrogramih). S HTS lahko dobimo veliko število zadetkov. Je pa v primerjavi z virtualnim rešetanjem drag in zahteven. Pristope HTS lahko poleg tega uporabljamo tudi za optimizacijo. Z njimi lahko tudi vrednotimo topnost ter vpliv na encim citokrom P450. V relativno kratkem času nam dajo rezultate o aktivnosti na tarčo (14).

1.2.2 Virtualno rešetanje

Znanost vse bolj posega po virtualnih metodah za napovedovanje lastnosti snovi na različnih področjih, tudi pri načrtovanju novih zdravilnih učinkovin. V začetni fazи so za iskanje novih spojin najbolj primerne računalniške metode. Ena izmed njih je tudi virtualno rešetanje.

Virtualno rešetanje je pojem za skupine metod, ki jih uporabljamo pri avtomatiziranem računalniško podprttem preiskovanju velikih virtualnih knjižnic spojin, s ciljem iskanja novih spojin vodnic (15) (slika 11).



Slika 11: Proses iskanja novih spojin z metodami virtualnega rešetanja.

Pristop je ekonomsko in časovno učinkovit in kljub temu dobro napove lastnosti posameznih spojin. Z virtualnimi metodami lahko napovemo interakcije med ligandom in tarčo (na primer receptorjem, encimom).

Virtualno rešetanje lahko temelji na strukturi (endogenega) liganda (če ne poznamo strukture tarče ali želimo le obogatiti knjižnico za HTS) ali na strukturi tarče. Lahko pa izvedemo paralelno virtualno rešetanje ali uporabimo modele s farmakofori, ki so ključni za interakcijo z encimom (14, 15).

Pri virtualnem rešetanju na osnovi liganda gre lahko za filtriranje s pomočjo osnovnih deskriptorjev 1D (preprosta, uporabna v zgodnjih fazah priprave knjižnice spojin in računalniško nezahtevna metoda), 2D rešetanje na osnovi podobnosti (gledamo skupne bite dveh spojin s pomočjo Tanimotovega indeksa in določimo podobnost med njima) in 3D rešetanje na osnovi podobnosti (z definiranjem farmakofornih točk ali s primerjavo volumnov in oblik molekul) (14, 15).

Deskriptor je številčna vrednost, ki jo dobimo eksperimentalno, logično ali matematično in je povezana s strukturo molekule (MW, logP, vsota polarnih površin atomov v molekuli).

S poznavanjem osnovnih farmakoformnih zahtev definiramo farmakofor, vendar nam 3D rešetanje lahko poda tudi spojine, ki so med seboj strukturno različne – to imenujemo "*Scaffold hopping*". Pri 3D rešetanju moramo paziti le na morebitne neustrezne rezultate, saj minimizirana konformacija ni vedno enaka konformaciji, ki je dejansko aktivna.

Spojine pretvorimo iz 2D v 3D zapis s pomočjo molekulske minimizacije. Tako najdemo konformacijo spojine (dolžine vezi, kote med atomi), ki je najbolj ugodna. Pri taki konformaciji je seštevek energijskih prispevkov najugodnejši – energetski minimum. 3D farmakofor vključuje stericne in elektronske lastnosti, ki so potrebne za zagotovitev optimalnih medmolekulskeih interakcij s specifično biološko tarčo. Te interakcije vodijo do indukcije ali inhibicije biološkega odziva.

Spojine v 3D obliki so zapisane in shranjene kot datoteke mol2 ali pdb, ki imajo zapisane koordinate za posamezne atome v spojni in njihovo orientacijo v prostoru. Nosijo pa tudi informacijo o povezavi med posameznimi atomi.

Za strukturno podprtvo virtualno rešetanje na osnovi tarče moramo poznati 3D strukturo tarče, ki jo dobimo s pomočjo rentgenske kristalografije, NMR spektroskopije ali homolognega modeliranja, če sta na voljo struktura podobnega proteina in aktivno mesto (14).

Za virtualno rešetanje najprej pripravimo tarčni protein (encim ali receptor), tako da mu določimo aktivno mesto, popravimo manjkajoče aminokisline, atome, minimiziramo energijo strukture in potencialno tudi izvedemo molekulske dinamike. Aktivno mesto določimo tako, da medsebojno primerjamo proteinske strukture, kar nam da najbolj ohranjene aminokisline. Nato sledi sidranje. Ligand se umesti v tarčo, nato program oceni vezavno energijo s pomočjo cenzilne funkcije in določi najbolj ugodno konformacijo. Glede na to, kako se ligand umešča v aktivno mesto, delimo programe za sidranje na simulacijske, sistematične in naključne. Pri naključnem umeščanju gre za semi-fleksibilno sidranje, saj program upošteva le fleksibilnost liganda, ne pa tudi tarče. Cenzilne funkcije so ključni del napovedovanja aktivnosti novih spojin, in so tudi del računalniške metode, pri katerih je pričakovati največji razvoj (14).

Z virtualnim rešetanjem lahko preizkušamo več deset ali sto tisoč spojin iz dostopnih podatkovnih baz. S pomočjo teh metod lahko začetno veliko knjižnico z ogromnim številom spojin filtriramo in tako skrčimo na manjše število spojin in dobimo bolj ciljano knjižnico s spojinami, ki so podobne spojini vodnici. Tako bomo knjižnico obogatili in dosegli večjo verjetnost, da bomo prišli do aktivne spojine. Knjižnico lahko filtriramo s pomočjo osnovnih deskriptorjev. Tako že izločimo spojine, ki bi jih po morebitnem dokazu aktivnosti, kasneje ne bilo mogoče optimizirati. Christopher A. Lipinski je postavil temelje za "*drug-like*" spojine, ki bi bile primerne za aktivne učinkovine z možnostjo optimizacije (14). Take spojine imajo ugodne farmakokinetične lastnosti (absorpcijo, porazdelitev, metabolizem, izločanje). Ugotovili so, da se z optimizacijo poveča molska masa in spremeni logP. Tako lahko zgubimo "*drug-like*" lastnosti, zato je Tudor I. Oprea vpeljal "*lead-like*" lastnosti, ki bi veljale za spojine vodnice (14). Pri filtriranju lahko pravila tudi prilagajamo, tako da pridemo do podobnih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki jih imajo že znani ligandi (in so pomembne za aktivnost), ki delujejo na tarčo, ki jo preiskujemo (14).

2. Načrt za delo

Pripravili bomo banko spojin Fakultete za farmacijo, sintetiziranih na Katedri za farmacevtsko kemijo. Spojine bomo zbrali in uredili skupaj po njihovi kemijski strukturi in po sinteznem procesu. Pripravili bomo 10 mM raztopine spojin v DMSO, ustrezne za biološko testiranje.

Vse spojine bomo računalniško pripravili v trodimenzionalni obliki v ChemBio 3D in z njimi opravili virtualno rešetanje s programom AutoDock in AutoDockVina. Uporabili bomo kristalno strukturo histonske deacetilaze 2 (HDAC2) z benzamidnim inhibitorjem (4-(acetilamino)-*N*-[2-amino-5-(tiophen-2-il)fenil]benzamidom) PDB: **4LY1** (16).

Najvišje rangirane zadetke bomo potem tudi vrednotili z encimskim testom na modelni epigenetski tarči - encimih HDAC. Za kontrolo bodo služili različni predstavniki strukturnih razredov naše kemijske knjižnice.

Za spojine, ki bodo izkazale preliminarno aktivnost, bomo ponovili vrednotenje še pri manjših koncentracijah, da potrdimo njihovo aktivnost, in za aktivne spojine določili še vrednost IC₅₀.

3. METODE IN MATERIALI

3.1 Priprava kemijske knjižnice

Materiali:

- trdni vzorci spojin, vsaj 95-odstotno čistih (HPLC) (> 300 spojin, Priloga II)
- dimetilsulfoksid - DMSO (extra pure 99,8%, C₂H₆O₈, M=78,13 g/mol), Merck, Nemčija.
- ocetna kislina (M = 60,05g/mol), Kemika, Hrvaška.

Oprema:

- vodna kopel,
- ultrazvočna kadička, PIO Iskra, Slovenija.
- mešalo, Vortex Domel Vibormix 114, Tehnica, Slovenija.

3.2 Virtualno rešetanje

Programska oprema:

- program AutoDock 4.0
- program AutoDockVina
- program ChemDraw 14.0
- program ChemBio 3D 14.0
- program AutoDockTools 4.0
- program Discovery Visualiser 4.0

3.3 Testiranje z encimskim testom

Materiali:

- 10 mM raztopine spojin v DMSO
- test HDAC activity, podjetja Sigma-Aldrich (Histone Deacetylase Assay Kit, Fluorimetric - CS1010): pufer – *Assay buffer*, *HDAC substrat solution*, *Trichostatin*, encim – *HeLa cell lysate, Developer solution*
- dimetilsulfoksid - DMSO

Oprema:

- mešalo Vortex
- 96 mikrotitrski ploščice Nunc® FluoroNuncTM, črne
- avtomatske pipete Biohit, Švedska.
- fluorescenčni spektrofotometer – čitalec BioTek Synergy H4 Hybrid Microplate Reader

4. POSTOPEK DELA

4.1 Priprava knjižnice spojin

Najprej smo pripravili vzorce. Natehtali smo 3-7 mg trdnih spojin glede na njihovo molsko maso, da smo pripravili predviden volumen in ustrezeno koncentracijo končnih vzorčnih raztopin. Pripravili smo 10 mM raztopine s končnim volumenom 1,5-2,0 mL.

Kot topilo smo uporabili dimetilsulfoksid (DMSO). Prednosti DMSO-ja so, da ga biološki sistemi dobro prenašajo, se meša z vodo in je v njem za večino spojin verjetnost topnosti največja. Žal je pri določenih koncentracijah DMSO tudi inhibitor nekaterih encimov, kar je potrebno preveriti. Pri raztopljanju v vodi bi bila večja verjetnost kemijske nestabilnosti spojin. Za banko spojin, namenjeno robotiziranemu upravljanju, smo spojine redčili v razmerju 1 : 10, pripravili smo 1 mM raztopino, v posebne viale, namenjene robotskemu rokovjanju.

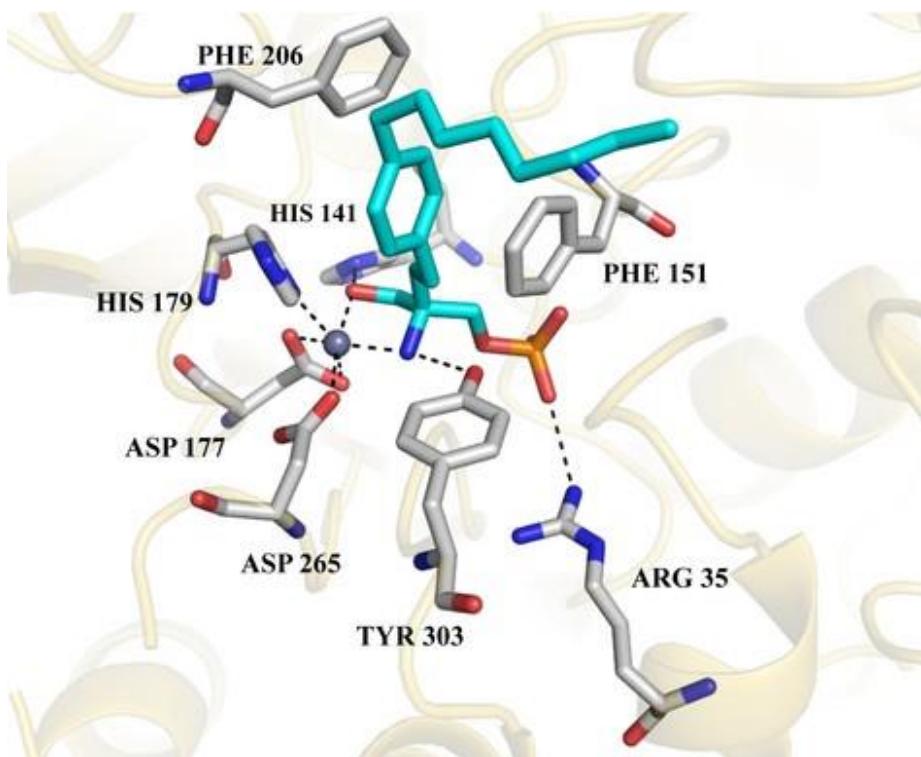
Spojine smo raztopili in vzorce zmrznili v hladilniku, v trdni obliki, saj je zmrzišče/tališče DMSO-ja pri 16°C. Na tak način povečamo stabilnost spojin. Poleg same stabilnosti spojin, je drugi velik problem pri pripravljanju spojin, topnost spojin v DMSO. Pripravili bi lahko 10 mM ali 1 mM raztopine, kar je sicer najbolj pogost primer. Z 1 mM raztopinami bi si lahko olajšali delo, saj je pri tej koncentraciji večje število topnih in se izognemo problemu z obarjanjem spojin, vendar moramo biti pazljivi saj s pripravo 1 mM raztopine pripravimo 10-krat manjšo testno koncentracijo učinkovine. Pri slabo topnih spojinah smo si za boljše raztopljanje pomagali s segrevanjem in ultrazvokom v ultrazvočni kadički. Pri nekaterih smo dodali ocetno kislino ($M = 60,05 \text{ g/mol}$) v molskem razmerju 1 : 10 s spojino.

Po odmrzovanju bi se spojine lahko oborile, na kar smo bili pozorni pri odmrzovanju raztopin. Obarjanje je tudi velik problem, kadar so raztopine namenjene robotskemu, avtomatskemu rokovjanju, v teh primerih se zato raje uporablja 1 mM raztopine.

4.2 Virtualno rešetanje

Pri delu smo uporabili virtualno rešetanje na osnovi poznane strukture biološke tarčne makromolekule – encima histonske deacetilaze (pdb koda: **4LY1**), ki je HDAC2. Uporabili smo metodo sidranja molekul preiskovane knjižnice v aktivno mesto encima v programu AutoDockVina (17).

HDAC2 je sestavljen iz treh aminokislinskih verig, ki skupaj štejejo 369 aminokislin in je humanega izvora. V aktivnem mestu encima je Zn^{2+} ion, ki interagira z NH skupino (slika 12).



Slika 12: Vezavno mesto HDAC ponazarja dele encima in aminokisline, ki sodelujejo pri interakciji z ligandom ((2S)-2-amino-2-[2-(4-oktilfenil)ethyl]-1-(dihidrogen fosfat)-1,3-propandiol).

Iz encima smo izbrisali molekule vode, ione (razen Zn^{2+}), molekule liganda (4-(acetilamino)-*N*-(2-amino-5-(tiophen-2-il)fenil)benzamid) ter ostale dele, ki so za sidranje nepomembni (ukazi: *deleteAtomSet*, *deleteMol*, *deleteHydrogens*, *deleteResidueHOH*). V molekulo encima smo vnesli polarne vodikove atome. Ti so pripeti na heteroatome in so sposobni tvoriti vodikove vezi. Sidranje poteka na podlagi računanja elektrostatskega polja oz. energij interakcije med encimom in različnimi ligandi. Označili smo tudi Kollmanove atomske naboje in solvatacijske parametre. Vrednost Kollmanovih nabojev določimo glede na prisotne

aminokisline iz predhodno izračunanih (tabelaričnih) vrednosti. Določili smo koordinate vezavnega mesta ($center_x = 2.6$, $center_y = -32.5$, $center_z = -43.1$) oz. center ter velikost *Grid* ($size_x = 20$, $size_y = 20$, $size_z = 20$), v katero smo nato sidrali spojine. S pomočjo ChemDraw programa smo pripravili še ligande v primerni obliki za sidranje. Shranili smo vse spojine z različno usmerjenostjo stereogenih centrov - torej vse enantiomere. Za virtualno rešetanje smo nato spojine, narisane s pomočjo programa ChemDraw v programu ChemBio 3D minimizirali s protokolom MM2, da smo dobili spojine v konformaciji z najmanjšo in najbolj ugodno energijo. Izbrisali smo tudi nepolarne vodikove vezi ter določili parcialne atomske naboje. Nato smo spojine shranili v formatih mol2 in pdb.

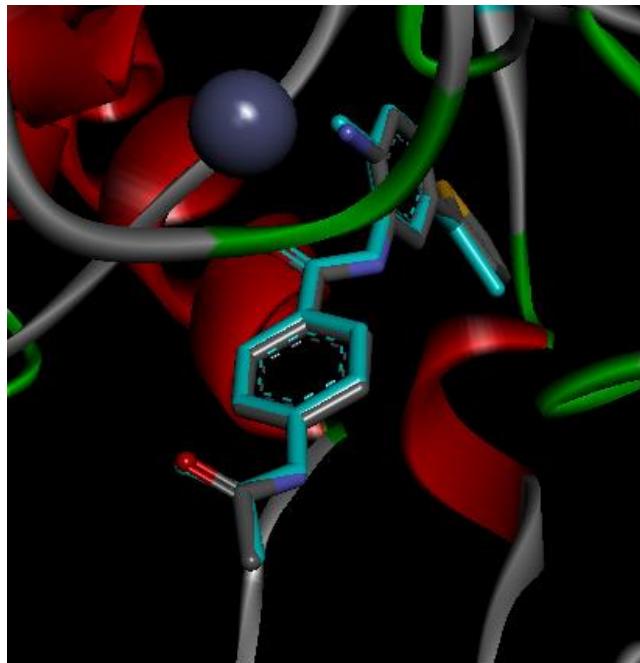
V programu AutoDockTools smo amidne in benzamidinske rotirajoče vezi odznačili kot rotirajoče med potekom sidranja. S tem smo skrajšali čas računanja pri sidranju. Sidranje smo izvedli s pomočjo skripte za več spojin naenkrat. Sidranje poteka tako, da se ligand naključno umesti v aktivno mesto, algoritem pa nato naključno spreminja njegove torzijske kote, rotacijo in translacijo (z genetskim algoritmom). Za samo umeščanje smo uporabili tehniko LGA ("Lamarckian genetic algorithm") z naslednjimi parametri: začetna populacija 250 naključno izbranih možnih vezav, maksimalno število vrednotenja energijske vrednosti $1,25 \times 10^6$, maksimalno število variant 127.000, stopnja mutacije 0,02 in "cross-over rate" 0,80. Uporabili smo tudi proporcionalen izbor z izračunom najslabše povprečne energije za 1 varianto. Pri tehniki LGA smo kot iskalni metodi uporabili pseudo-Solis in Wetsovo metodo lokalnega iskanja z maksimalno 300 ponovitvami na eno iskanje in verjetnostjo opravljenega lokalnega iskanja na delu izbrane populacije 0,06 (18). Ligandi s podobno strukturo so bili združeni v gruče. Program je ocenil vezavno energijo za različne konformacije liganda. Najboljša konformacija je tista, ki da največjo negativno energijo. Program to doseže tako, da išče energetski minimum. Metoda sidranja razvrsti spojine glede na izračunano vezavno energijo od najboljše do najslabše. Napove položaj spojine, konformacijo in lego liganda, vezanega v aktivnem mestu tarče, ter oceni aktivnost. S sidranjem napovemo 3D strukturo vezanega liganda na protein.

Pomemben je učinkovit iskalni algoritem programa za sidranje, ki pravilno umesti ligande v aktivno mesto encima, cenilna funkcija pa mora biti robustna, da z njo dobimo natančno razvrstitev izračunanih kompleksov po energiji interakcije liganda z encimom. Vezavna energija je sestavljena iz Van der Waalsovih vezi, H-vezi in elektrostatskih interakcij.

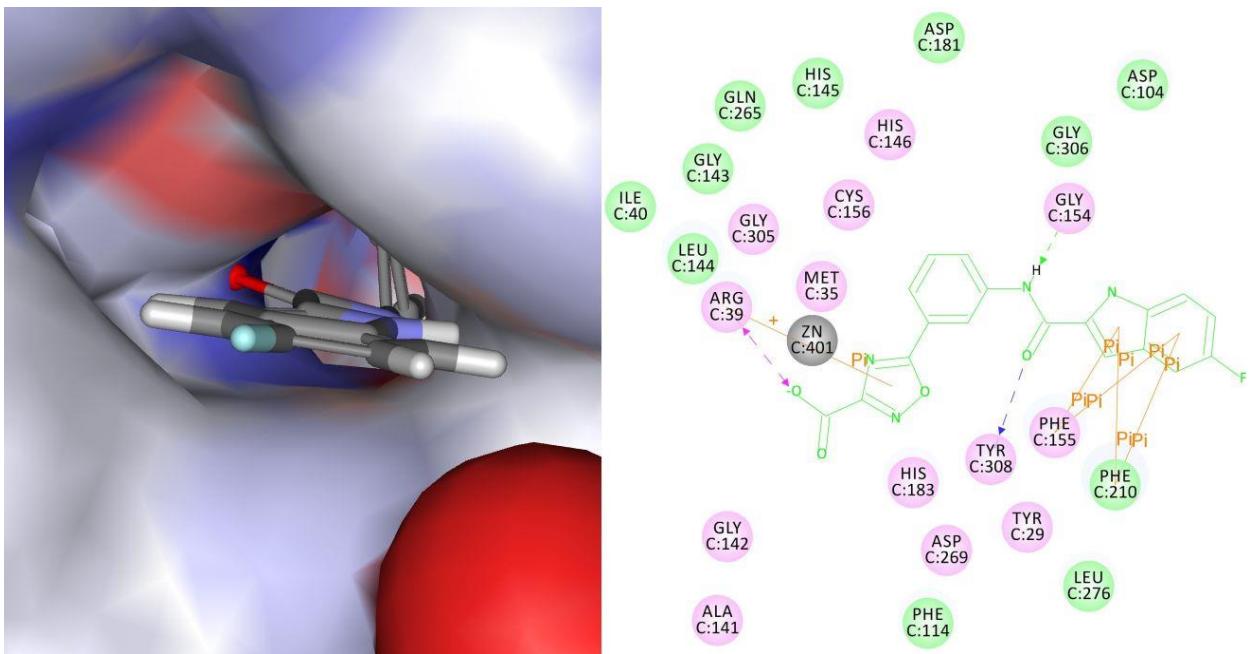
Konformacije, ki so dale najboljši rezultat, smo zbrali in ročno vnesli v eno datoteko in nato spojine in prileganje encimu pogledali s pomočjo programa Discovery Visualiser, v katerem

smo lahko za vsako spojino posebej preverili ustreznost sidranja (slika 13), ter analizirali interakcije z vezavnim mestom (slika 14).

Najboljše spojine glede na rezultat izračunane vezavne energije pri sidranju smo zbrali v preglednico in jih testirali v "in vitro" testu.



Slika 13: S programom Discovery Visualiser smo pogledali, kako so se posamezne spojine umestile v encim HDAC2.



Slika 14: Vizualizacija interakcij spojine ZJ-154 z vezavnim mestom HDAC2. Na levi strani je prikazano umeščanje spojine v vezavno mesto in komplementarnost s površino encima HDAC2, na desni strani pa so prikazane interakcije posameznih funkcionalnih skupin ZJ-154 s posameznimi aminokislinami vezavnega mesta in Zn^{2+} .

4.3 Testiranje z encimskim testom

Spojinam smo določili zaviralno delovanje na zmesi encimov histonske deacetilaze z uporabo testa HDAC activity, podjetja Sigma-Aldrich (Histone Deacetylase Assay Kit, Fluorimetric - CS1010), ki je enostaven za določanje aktivnosti HDAC in temelji na dveh encimskih reakcijah. Prva reakcija je deacetilacija stranske verige lizina s HDAC encimom (*HeLa cell extract*), tej pa sledi odcepitev deacetiliranega dela (*Developer Solution*) in tako se sprosti skupina, ki fluorescira.

Spojine smo najprej odmrznili in pogledali, če se je katera izmed njih oborila. Take spojine smo homogeno premešali na mešalu Vortex in jih ponovno raztopili. Najprej smo pripravili vzorce za testiranje, in sicer smo jih redčili 1 : 10 z avtoklavirano vodo (5 µL 10 mM raztopine spojine v DMSO) in jih premešali na mešalu Vortex. Dobili smo koncentracijo vzorcev za testiranje, ki je znašala 1 mM, in z 10-odstotno vsebnostjo DMSO. Končna testirana koncentracija spojine v mikrotitrski ploščici je bila 50 µM, in z 0,5-odstotno vsebnostjo DMSO. Test smo izvajali na mikrotitrski ploščici črne barve, ker se svetloba na temnem ozadju odbija in je tako dal fluorescenčni spektrofotometer pri merjenju najboljši signal. V vse vdolbinice smo najprej dali pufer (40 µL) - *Assay buffer*. Nato smo dodali vzorce (5 µL) ali ustrezeno raztopino inhibitorja trihostatina A (končna koncentracija – 25 nM). V eno odprtinico smo dali samo 10-odstotni DMSO (tega smo ga prav tako redčili 5 : 45). Nato smo dodali zmes encimov HDAC, pridobljenih z izolacijo z afinitetno kromatografijo iz lizata celic HeLa - *HeLa cell lysate* (5 µL); slepa kontrola ni vsebovala te zmesi. Končni volumen v odprtini je bil 100 µL. Vsebino smo premešali in inkubirali v temnem prostoru 30 min pri 30 °C. Nato smo dodali v vse odprtinice *Developer solution* (10 µL), premešali in inkubirali 10 min. Produkt encimske reakcije nam je dal fluorescenčni signal. Več je bilo produkta, večji signal smo dobili. Meritve smo izvedli na fluorescenčnem spektrofotometru BioTek Synergy H4 Hybrid Microplate Reader pri valovni dolžini ekscitacije 360 nm in emisije 460 nm. Princip fluorescence je, da pri nižji valovni dolžini vzbujamo - ekscitacija, nato pa pri višji valovni dolžini poteka emisija svetlobe v obliki fluorescence. Označili smo katera odprtinka je vsebovala kontrolo - slepo raztopino, saj je aparat najprej tam meril fluorescenco in na podlagi te meritve meril naprej v ostalih z ustrezeno intenziteto (funkcija *auto gain*). Spojine, pri katerih je bila stopnja inhibicije dovolj nizka, rezidualna aktivnost je bila manjša kot 50 %, smo nato ponovno testirali v enaki koncentraciji - 50 µM. Nekatere spojine smo testirali dvakrat, v dveh različnih koncentracijah (25 in 12,5 µM).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri pripravi knjižnice spojin so bile v večini vse spojine dobro topne. Težavno raztapljanje je bilo le pri nekaterih iz skupine spojin, pripravljenih kot dulalni inhibitorji faktorja Xa in fibrinogenskega receptorja, zato smo si pri njih za boljše raztapljanje pomagali s segrevanjem in ultrazvokom.

Opazili smo, da nekatere spojine močno absorbirajo ultravijolično svetlobo in so zato obarvane (rumeno), kar je lahko velik problem pri nekaterih spektrofotometričnih testih, vendar načeloma ne pričakujemo težave pri fluorometričnem testu. Pri dveh spojinah iz te serije (KUT - 459 in KUT - 466) pa smo za povečanje topnosti dodali ocetno kislino ($M = 60,05 \text{ g/mol}$) v molskem razmerju 1 : 10 s spojino.

Priprava ustreznih raztopin je zelo zamudno delo, zato je povsem jasno zakaj so takšni napor pri avtomatizaciji tega procesa. Glede na celoten postopek sama priprava raztopin zavzame neproporcionalno velik delež časa.

Nato smo na vseh spojinah računalniško izvedli virtualno rešetanje. Na podlagi rezultatov sidranja smo izbrali spojine, ki so izkazovale najboljšo energijo vezave (preglednica I).

Pomanjkljivost pri izvajanju sidranja izvira iz samega encima. Mi smo izvedli sidranje le na en določen encim - HDAC2. Celice HeLa, ki smo jih uporabili pri encimskem testiranju pa predstavljajo zmes 8 encimov. Praviloma bi morali iskati izooblike encimov, na katere spojine res delujejo.

Preglednica I: Seznam spojin, ki so izkazovale najboljše energije vezave, njihove vrednosti izračunanih energij vezave, delež rezidualne aktivnosti HDAC encimov za posamezne spojine (0 % - popolna inhibicija, 100 % - ni inhibicije).

Spojina	Energija vezave (kJ/mol)	Delež rezidualne aktivnosti (RA%) pri 50 μM	Spojina	Energija vezave (kJ/mol)	Delež rezidualne aktivnosti (RA%) pri 50 μM
ZJ-154	-11,0	122	ZJ-130	-9,2	146
ZJ-129	-10,9	163	KUT-239_SS	-9,1	121
DNN-39_S	-10,3	81	DNN-43_R	-9,1	53
ZJ-153	-10,2	154	DNN-40_R	-9,1	42, 90, 102
ZJ-121	-10,1	135	NCH-8_R	-9,1	192
DNN-40_S	-9,9	42, 90, 102	NCH-9a_R	-9,1	159
UL-KLS-5_S	-9,9	147	KUT-184_R	-9,0	129, 86
DNN-24_R	-9,8	87	DNN-37_R	-9,0	63,73
DNN-24_S	-9,8	87	NCH-7_R	-9,0	107
ZJ-131	-9,8	145	DNN-27_R	-8,9	66
KUT-239_RR	-9,7	121	DNN-43_S	-8,9	53
DNN-33_SR	-9,6	61	NCH-6	-8,9	123
NCH-6a	-9,6	66	NCH-9_R	-8,9	163
DNN-39_R	-9,5	81	ZJ-135	-8,9	154
NCH-8a_S	-9,5	152	KUT-439_R	-8,9	116
SLT-9	-9,5	162	KUT-503_R	-8,8	55, 163
NHM-29	-9,5	138	KUT-239_SR	-8,8	82
NCH-8a_R	-9,4	152	DNN-37_S	-8,8	63,73
UL-KLS-12_S	-9,4	153	SLT-8	-8,8	178
NHM-27	-9,4	160	UL-KAZ-08	-8,8	120
DNN-38	-9,3	80	KUT-444_R	-8,8	137
NCH-8_S	-9,3	192	DJI-105_S	-8,7	73, 111
NCH-9a_S	-9,3	159	DPD-111_S	-8,7	107
DNN-28	-9,2	42, 78, 23	UL-KAZ-10	-8,7	130
NCH-7_S	-9,2	107	UL-KLS-8_S	-8,7	152

Z encimskim testom je bilo smiselno testirati predvsem spojine, ki so izkazovale dobro energijo vezave. Pri izvedbi encimskega testa smo dobili deleže rezidualne aktivnosti posameznih spojin pri določeni koncentraciji. Nekaterim naključno izbranim spojinam smo ponovili meritev, da smo preverili ponovljivost testa. Ugotovili smo, da je razlika med posameznimi meritvami istih spojin kar precejšnja, kar smo lahko pričakovali, saj gre za biološki test, pri katerih je variabilnost lahko velika. Zato smo spojine, ki so izkazovale aktivnost, delali v dveh ponovitvah.

Za spojino DTT-49 smo ponovili meritev trikrat. Posamezni odzivi so bili RA = 48 %, RA = 70 % in RA = 39 %; povprečna vrednost RA = 52 ± 16 %, koeficient variacije pa 30 %. Možne napake pri izvedbi testiranja na encimu HDAC so bile tudi: zmotljivost, navzkrižna kontaminacija (pri pipetiranju), artefakti zaradi redčenja, optične napake instrumenta, veliki šumi, nenatančnost pri delu in nenatančnost instrumentov (pipete).

Kjer je bila v mikrotitrski ploščici kontrola 0%, tam je bila inhibicija popolna in izmerjena fluorescenza je bila nizka (grafično je to prikazano z obarvanostjo v svetlo modri barvi v preglednici II). Kjer pa je bila 100% kontrola, inhibicije ni bilo in izmerjena fluorescenza je bila visoka (grafično je to prikazano z obarvanostjo v temno modri barvi). Posledično so spojine, ki so dale bolj svetlo modro obarvanost boljši inhibitorji in obratno. Trihostatin A, kot močan inhibitor HDAC, je dal svetlo modro obarvanost (preglednica II). Kontrolno mesto s slepo vrednostjo (0 %) je imelo izmerjeno vrednost fluorescence 183, kontrolno mesto s pozitivno kontrolo (100 %) pa je imelo izmerjeno vrednost fluorescence 657, kar pomeni da imamo 3,6-kratni razpon med pozitivno in negativno vrednostjo, kar je relativno slab rezultat in tudi vzrok za relativno velika odstopanja in slabo ponovljivost testa. Proizvajalec navaja da je faktor 2 zadovoljiv rezultat, podobni testi pa imajo lahko faktor med 10 in 100.

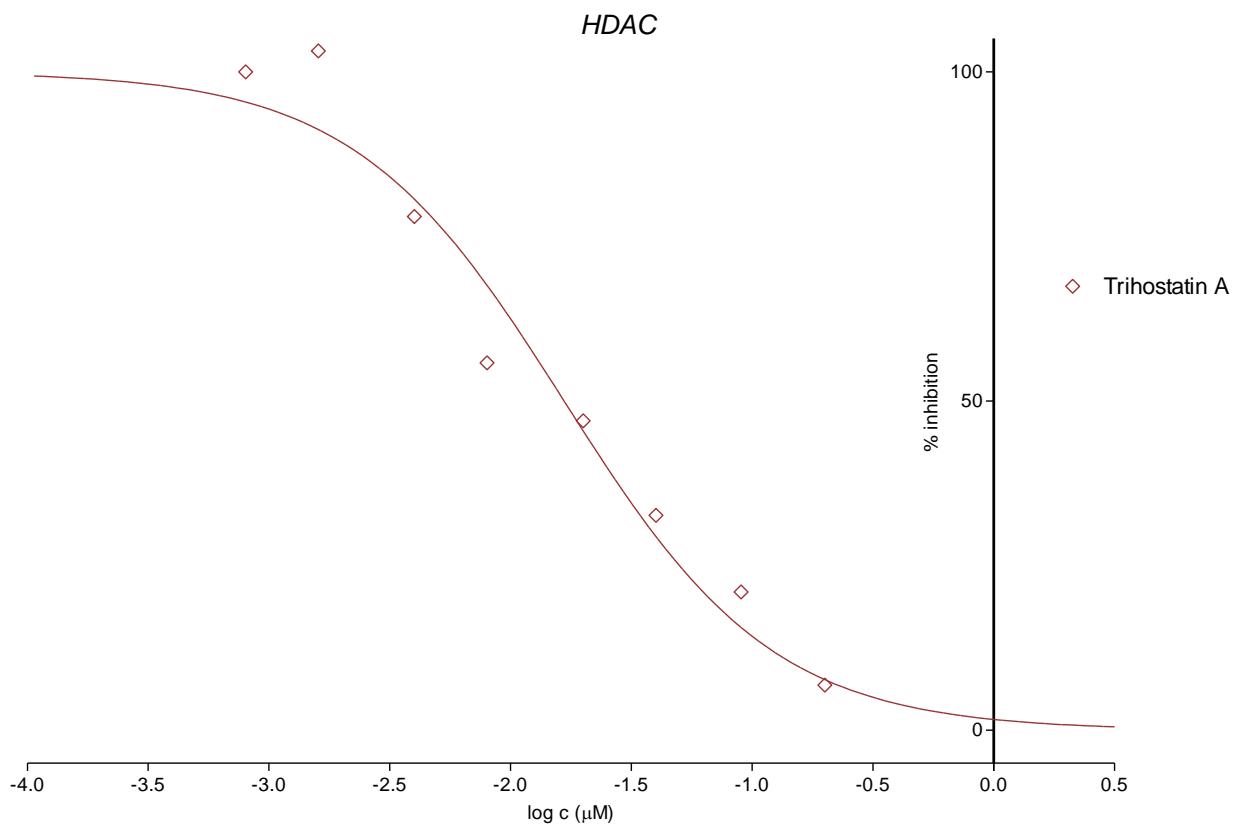
Preglednica II: Preglednica prikazuje izmerjeno fluorescenco v posameznih poljih (A1 do G6), ob dodatku izbrane spojine pri $50 \mu\text{M}$ koncentraciji. Polje H2 predstavlja slepo kontrolo – 0 % (brez dodatka encimov HDAC - *HeLa cell lysate*), polje H1 pa pozitivno kontrolo – 100 %. V polje H4 smo dali testno spojino trihostatin A ($2,5 \mu\text{M}$). V polje H3 smo dodali samo pufer, brez vsebnosti DMSO in vidimo da 0,5 % DMSO ne izkazuje inhibitornega delovanja.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	742	676	662	602	712	663						
B	745	726	679	649	746	661						
C	722	663	669	181	659	663						
D	781	570	621	614	670	630						
E	724	662	630	642	686	643						
F	781	668	643	645	1145	655						
G	653	601	640	630	626	627						
H	656	183	657	182	1078	662						

Želeli smo najti spojine novega strukturnega razreda. Zanimive so bile spojine, kjer je bila rezidualna aktivnost pod 50 % pri testirani koncentraciji $50 \mu\text{M}$. To bi pomenilo da ima spojina $\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$ ali manj. Takih spojin je bilo 18 od 182 in pri teh vzorcih smo testiranje ponovili. Nekatere spojine so dale rezultat več kot 100 %, kar pomeni, da je bil test lahko slabo izveden ali pa je bila prisotna pozitivna interferenca spojine.

Pri zadnjem testiranju smo zanimive spojine testirali v dveh ponovitvah, in sicer v 10 in $100 \mu\text{M}$ koncentraciji. Pri $100 \mu\text{M}$ koncentraciji inhibitorja (spojoine) je bila inhibicija večja oz. bolj izrazita. Spojine, ki smo jih testirali večkrat, smo obravnavali ločeno, da smo ugotovili, ali so meritve logične ali pa je prihajalo do sisanja rezultatov. Ponekod so bile opazne razlike; npr. da je spojina enkrat izkazovala aktivnost – inhibicijo (0-50 %), drugič pa ne. Tako veliko odstopanje nakazuje na napako pri sami izvedbi testiranja.

V prvotnem načrtu je bilo, da bomo za optimalne spojine določili vrednosti IC_{50} , vendar nobena spojina ni izkazovala dovolj visoke aktivnosti, tako da smo določili IC_{50} samo za kontrolno spojino, trihostatin A (slika 14), $\text{IC}_{50} = 16,7 \text{ nM}$.



Slika 14: Graf zaviranja delovanja HDAC v odvisnosti od logaritemske koncentracije trihostatina A (sigmoidna krivulja) – $\text{IC}_{50} = 16,7 \text{ nM}$.

Dobili smo klasično sigmoidno krivuljo, iz katere smo s programom GraphPadPrism izračunali vrednost IC_{50} . S tem smo tudi potrdili, da je test ustrezен in da je odsotnost pozitivnih rezultatov pri naših testiranih spojinah dejansko posledica neaktivnosti naših spojin.

6. SKLEP

Pripravili smo knjižnico s 300 spojinami primerno za virtualno rešetanje, ki smo ga izvedli na encim HDAC2 (pdb koda: **4LY1**).

Uspešno izvedli testiranje spojin iz knjižnice še z encimskim testom HDAC. Za kontrolo smo testirali spojino trihostatin A, ki je dala literaturno primerljive rezultate in se izkazala kot močan inhibitor HDAC.

Žal nobena od testiranih spojin iz knjižnice, ni dala rezultatov, da bi katero izmed njih okarakterizirali kot dober inhibitor HDAC, saj so se vsi prvotni zadetki, po nadalnjem preverjanju, izkazali za lažno pozitivne.

Korelacija med rezultati virtualnega rešetanja in testiranjem z encimskim testom je bila slaba. Nekatere spojine so dale dobre rezultate pri encimskem testiranju, veliko število pa jih je izkazovalo dober rezultat pri virtualnem rešetanju. Želeli smo odkriti spojino, ki bi dala s testiranjem ponovljiv rezultat za delež rezidualne aktivnosti (RA%) pod 50 % pri 50 μM koncentraciji in čim nižjo energijo pri umeščanju v sam encim.

Nobena izmed spojin ni ustrezna za nadaljne testiranje. Razlog za neuspešno iskanje spojin vodnic je najverjetneje v premajhnem številu spojin v izvorni knjižnici.

Pričakovali bi lahko boljšo korelacijo med virtualnim rešetanjem in testiranjem z encimskim testom, če bi sidrali spojine v posamezne izooblike HDAC in potem tudi izvedli testiranje na posameznih izooblikah HDAC.

V želji po odkritju novih inhibitorjev HDAC bi lahko virtualno rešetali veliko več spojin, saj se je izkazalo, da bi le redke učinkovine dale pozitiven rezultat po testiranju.

Literatura

1. Taylor J. B, Triggle J. D: Comprehensive Medicinal Chemistry, Elsevier, Michigan, 2007: 251-278.
2. internetni vir: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Epigenetika>, dostopano junija 2015
3. Internetni vir: <http://www.del.si/druzba/znanost/epigenetika-tudi-okolje-vpliva-na-dedne-spremembe.html>, dostopano maja 2015
4. Internetni vir: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Kromatin>, dostopano junija 2015
5. Internetni vir: <http://www.epigenome.org/index.php>, dostopano junija 2015
6. Sippl W, Jung M: Epigenetics targets in drug discovery, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009: 42: 3-23.
7. Bottomley M. J, Lo Surdo P, Di Giovine P, Cirillo A, Scarpelli R, Ferrigno F, Jones P, Neddermann P, De Francesco R, Steinkühler C, Gallinari P, Carfí A: Structural and Functional Analysis of the Human HDAC4 Catalytic Domain Reveals a Regulatory Structural Zinc-binding Domain. *J Biol Chem.* 2008; 283(39): 26694–26704.
8. Lauffer B, Mintzer R, Fong R, Mukund S, Tam C, Zilberleyb I, Flicke B, Ritscher A, Fedorowicz G, Vallero R, Ortwine F. D, Gunzner J, Modrusan Z, Neumann L, Koth M. C, Lupardus J. P, Kaminker S. J, Heise E. C, Steiner P: Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. *J Biol Chem.* 2013; 288(37):2 6926-43.
- 9.
10. Trošelj G. K, Kujundžić N. R, Grbeša I: Epigenetika i fiziologija gena. *Medicina* 2009; 45, 127-135.
11. Marks P. A, Xu W. S: Histone Deacetylase Inhibitors: Potential in Cancer Therapy. *J. Cell. Biochem.* 2009; 107(4): 600-8.
12. de Ruijter A. J, van Gennip A. H, Caron H. N, Kemp S, van Kuilenburg A. B: Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *J Biol Chem* 2003; 370(Pt 3): 737-49.
13. Jukič M, Perdih A, Šolmajer T: Integriran pristop iskanja spojin vodnic naravnega izvora z uporabo eksperimentalnih in računalniško podprtih metod. *Farm Vestn* 2012; 63: 1-64.
14. Wermuth C: The Practice of Medicinal Chemistry, Elsevier, London 2008: 1-982.

15. Sippl W, Jung M: Epigenetics targets in drug discovery, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009: 57-87.
16. Internetni vir: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4LY1>
17. Trott O, Olson J. A: AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. JCC 2010; 31: 455-461.
18. Kikelj D, Štefanič P, Mravljak J, Sollner Dolenc M, Anderluh M: Novel Antithrombotic Compounds with Dual Function Structural and Functional Analysis of the Human. J Biol Chem. 2008; 51(18): 5627.

Priloge

Priloga I: Protokol testa (HDAC activity, Sigma-Aldrich, Histone Deacetylase Assay Kit, Fluorimetric - CS1010)

Po navodilu:

Dodamo 40 µL *Assay Buffer*

Dodamo 5 µL inhibitorja^{1,2}

Dodamo 5 µL *HeLa cell lysate*³

Dodamo 50 µL *HDAC Substrate Solution*⁴

Inkubiramo 30 min (lahko dlje) pri 30 °C

Dodamo 10 µL *Developer Solution*

Inkubiramo 10 min pri sobni temperaturi

Izmerimo fluorescenco $\lambda_{\text{ex}} = 360/40 \text{ nm}$ (350-380 nm), $\lambda_{\text{em}} = 460/40 \text{ nm}$ (440-480 nm)

¹ Končna koncentracija inhibitorja je 20 × manjša

² kot kontrolo uporabimo Trichostatin A, ki ga redčimo 40-krat z Assay Buffer

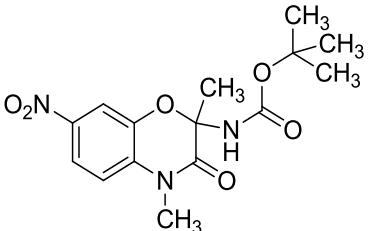
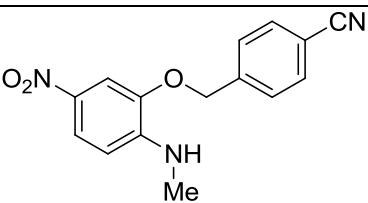
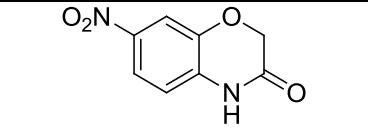
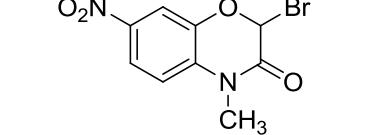
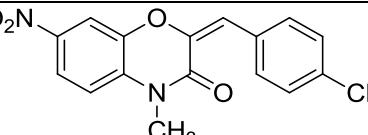
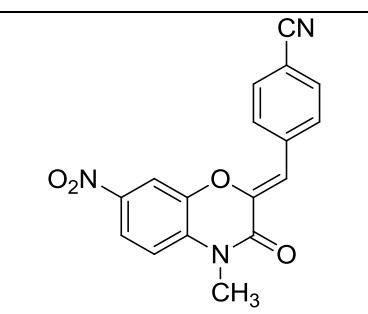
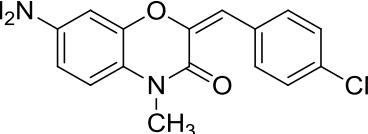
³ shranjevati pri – 70 °C po prvem odmrzovanju

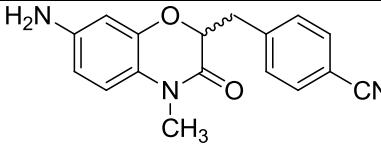
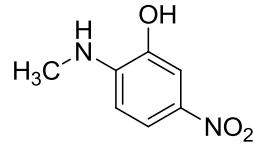
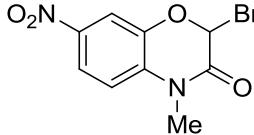
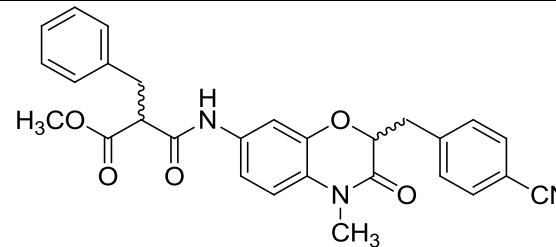
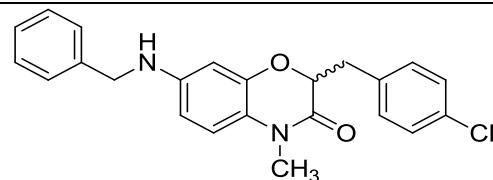
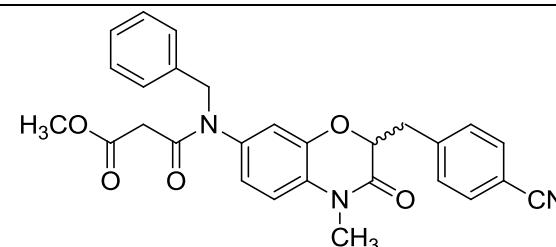
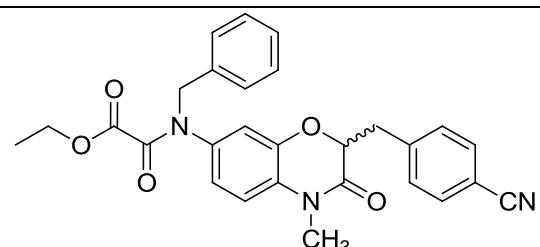
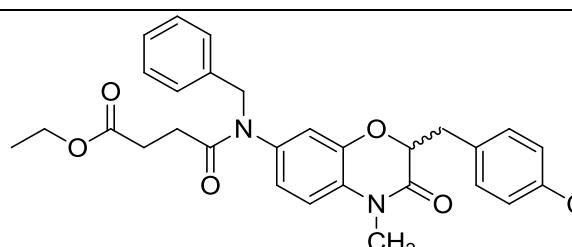
⁴ pred uporabo redčimo 100-krat z Assay Buffer (vzamemo 12,5 µL *HDAC Substrate Solution* in dodamo 1237,5 µL *Assay Buffer*)

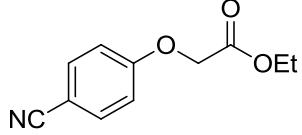
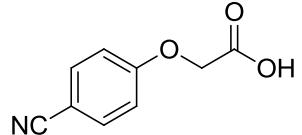
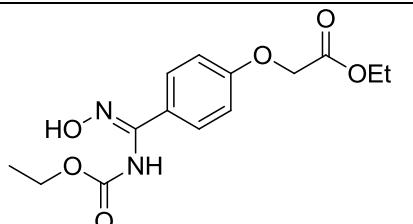
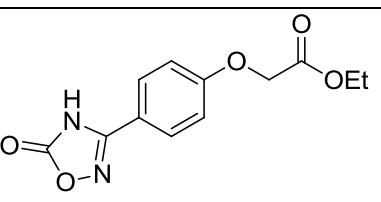
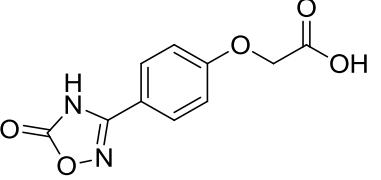
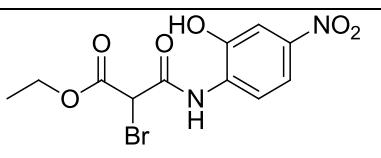
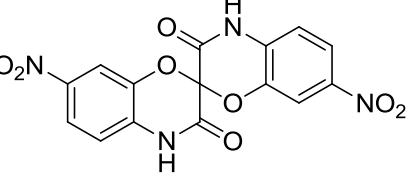
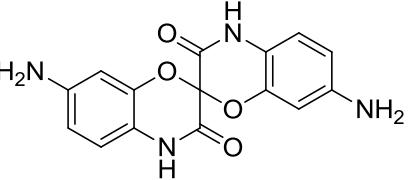
za 0 % (*blank*) ne dodamo *HeLa cell lysate*

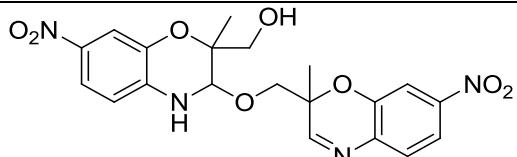
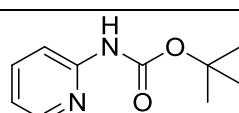
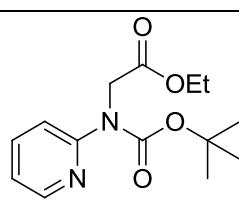
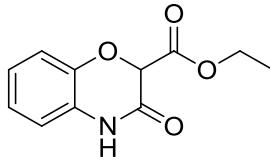
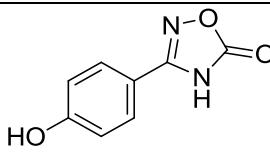
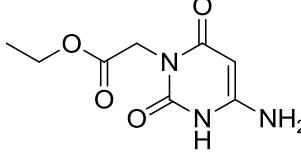
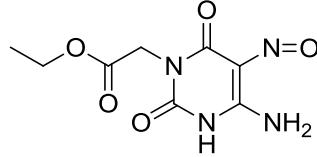
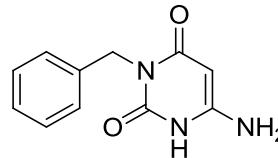
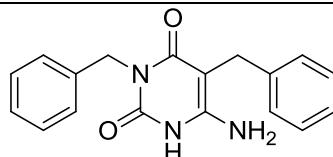
Priloga II:

Preglednica spojin iz preiskovane knjižnice, ki smo jim testirali inhibitorno aktivnost na encim HDAC2, njihove strukturne formule in izmerjeni deleži rezidualne aktivnosti, 0 % - popolna inhibicija, 100 % - brez inhibicije.

	DTT - 6	RA% = 71% @50µM
	DTT - 7	RA% = 82% @50µM
	DTT - 11	RA% = 75% @50µM
	DTT - 13	RA% = 47 , 51% @50µM
	DTT - 17a	RA% = 49,86% @50µM
	DTT - 17	RA% = 91% @50µM
	DTT - 18a	RA% = 83% @50µM

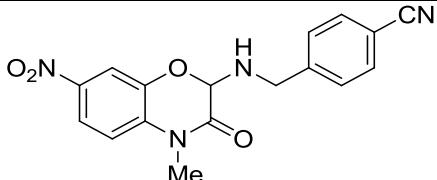
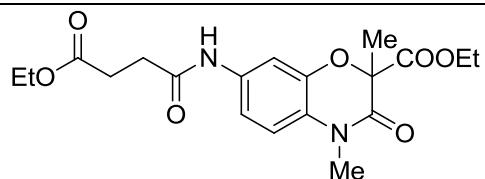
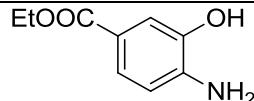
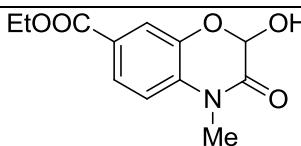
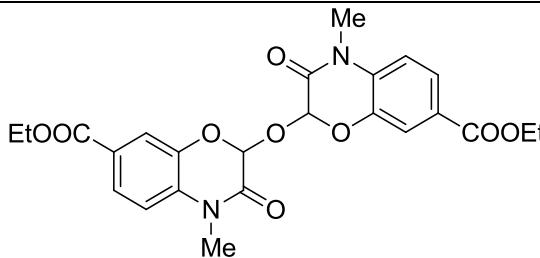
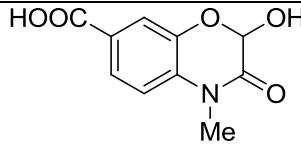
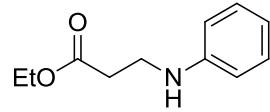
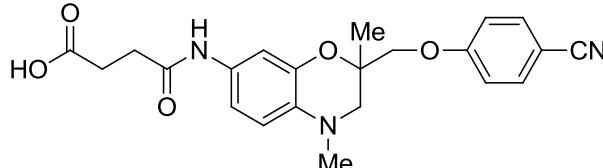
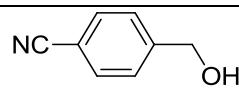
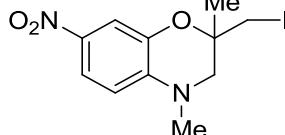
	DTT - 18	RA% = 85% @50μM
	DTT - 19a	RA% = 24, 50, 81, 103% @50μM 108% @ 50μM
	DTT - 20	RA% = 62% @50μM
	DTT - 22	RA% = 76% @50μM
	DTT - 46	RA% = 91% @50μM
	DTT - 47	RA% = 70% @50μM
	DTT - 48	RA% = 51% @50μM
	DTT - 49	RA% = 48, 70, 39 %@50μM

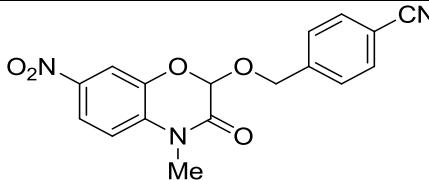
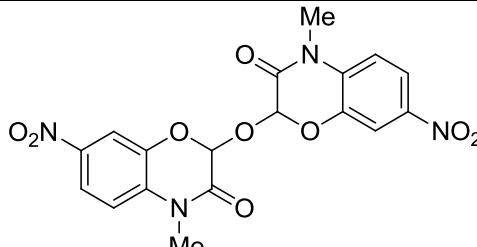
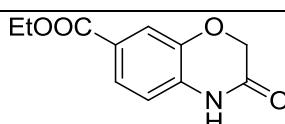
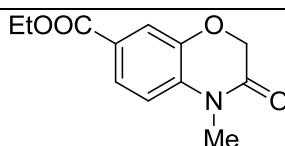
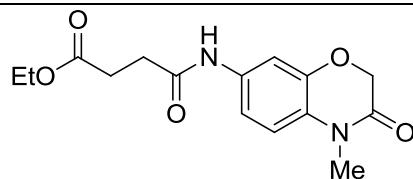
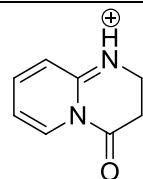
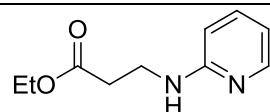
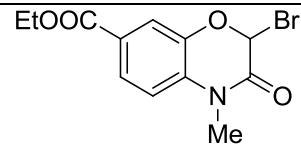
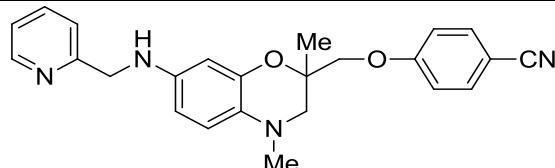
	IAA - 02	RA% = 128% @50μM
	IAA - 04	RA% = 96% @50μM
	IAA - 06	RA% = 105% @50μM
	IAA - 08	RA% = 119% @50μM
	IAA - 10	RA% = 114% @50μM
	IAA - 12	RA% = 114% @50μM
	IAA - 12 - p2	RA% = 116% @50μM
	JI - 03	RA% = 101% @50μM
	JI - 04	RA% = 109% @50μM
	JI - 06	RA% = 128% @50μM

	JI - 10	RA% = 59%@50μM
	JI - 11	RA% = 147%@50μM
	JI - 17	RA% = 127%@50μM
	JI- 19	RA% = 92%@50μM
	JI - 23	RA% = 113%@50μM
	JI - 29	RA% = 170%@50μM
	JI - 30	RA% = 102% @50μM
	JI - 33	RA% = 16%@50μM
	JI - 35	RA% = 119, 101%@50μM
	JI - 35A	RA% = 99%@50μM

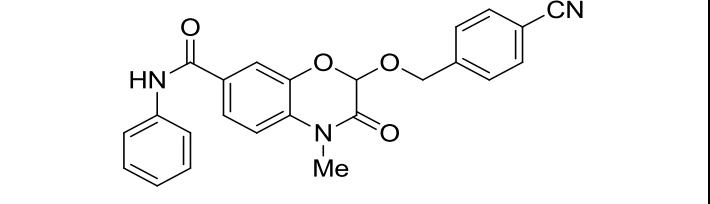
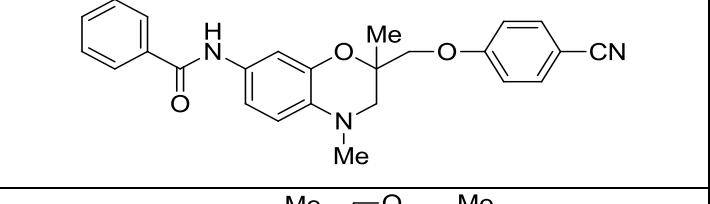
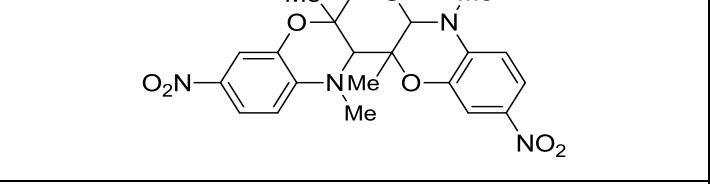
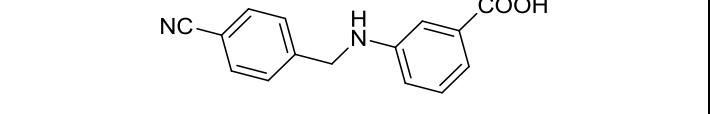
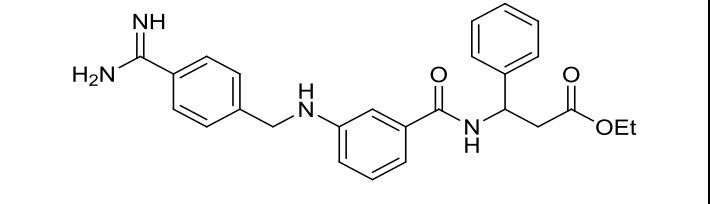
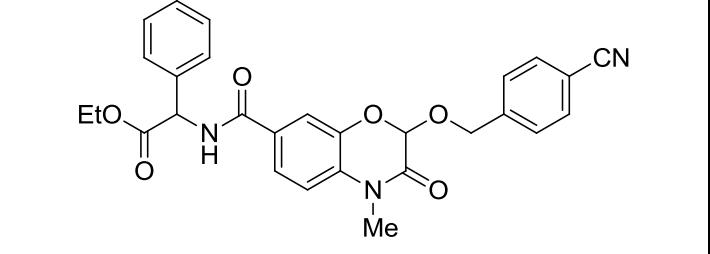
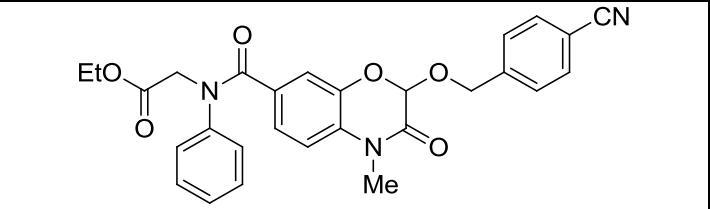
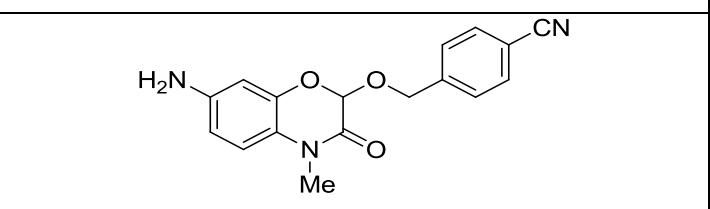
<chem>CN1C=CC2=C1C(=O)NC(C(=O)N(CCOC(=O)C)C(=O)Nc3ccccc3)C2=NO</chem>	JI - 36	RA% = 93% @ 50 μM
<chem>CCOC(=O)C1=CC2=C1C(=O)NC(C(=O)NCCOc3ccc4c(c3)C(=O)N(Oc5ccc(C#N)cc5)C4=O)N2C</chem>	JI - 38	RA% = 97% @ 50 μM
<chem>CCOC(=O)C1=CC2=C1C(=O)NC(C(=O)NCCOc3ccc(C#N)cc3)N2Cc4ccccc4</chem>	JI - 43	RA% = 118% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(C(C(=O)OC(=O)c4ccc(C#N)cc4)C3)C(=O)N2C</chem>	DTB - 1	RA% = 87% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(C(C(=O)OC(=O)CC)C3)C(=O)N2C</chem>	DTB - 2	RA% = 73% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(C(C(=O)OC(=O)c4ccc(C#N)cc4)C3)N(C)C(=O)C</chem>	DJI - 04	RA% = 180% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(CCOCC3)N(C)C(=O)C</chem>	DJI - 06	RA% = 88% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(C(C(=O)OC(=O)C)C3)N(C)C(=O)C</chem>	DJI - 08	RA% = 87% @ 50 μM
<chem>O=[N+]([O-])c1ccc2c(c1)C3(COC(=O)c4ccc(cc4)S(=O)(=O)c5ccccc5)N(C)C(=O)C</chem>	DJI - 09	RA% = 101% @ 50 μM

	DJI - 11	RA% = 66% @50μM
	DJI - 12	RA% = 20 % @50μM
	DJI - 16	RA% = 105% @50μM
	DJI - 20	RA% = 146% @50μM
	DJI - 21	RA% = 122% @50μM
	DJI - 26	RA% = 46, 45% @50μM
	DJI - 27	RA% = 69% @50μM
	DJI - 27a	RA% = 83% @50μM
	DJI - 31	RA% = 107% @50μM
	DJI - 35	RA% = 67% @50μM

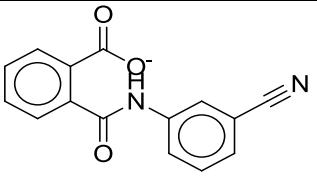
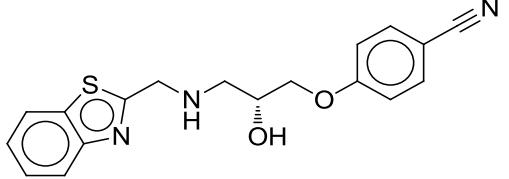
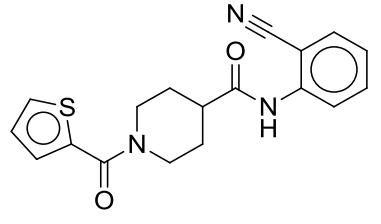
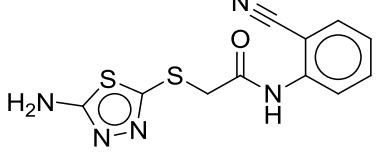
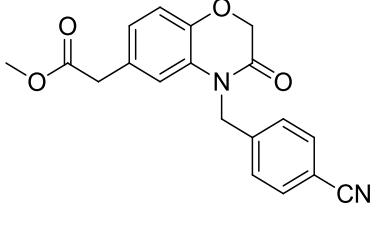
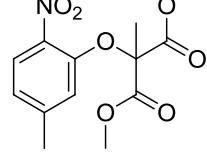
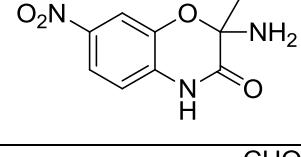
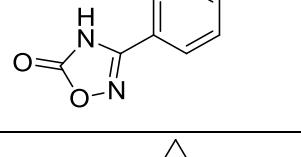
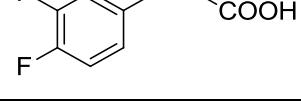
	DJI - 37	RA% = 112% @ 50 μM
	DJI - 41	RA% = 119% @ 50 μM
	DJI - 42	RA% = 59% @ 50 μM
	DJI - 45	RA% = 104% @ 50 μM
	DJI - 45b	RA% = 50% @ 50 μM
	DJI - 46	RA% = 191, 93% @ 50 μM
	DJI - 48	RA% = 69% @ 50 μM
	DJI - 49	RA% = 56% @ 50 μM
	DJI - 52	RA% = 134% @ 50 μM
	DJI - 53	RA% = 67% @ 50 μM

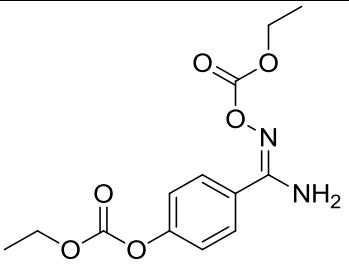
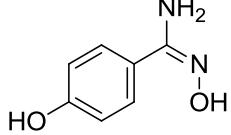
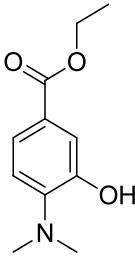
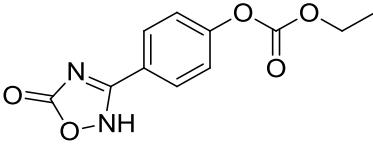
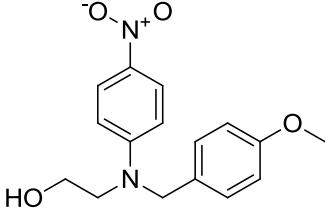
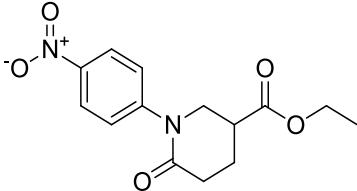
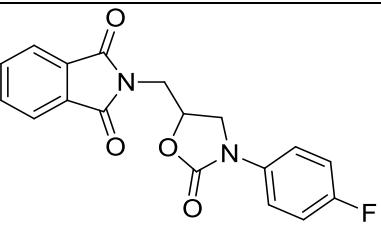
	DJI - 54	RA% = 60%@50μM
	DJI - 55	RA% = 61%@50μM
	DJI - 56	RA% = 100%@50μM
	DJI - 60	RA% = 107%@50μM
	DJI - 63	RA% = 54%@50μM
	DJI - 64	RA% = 234%@50μM
	DJI - 65	RA% = 126%@50μM
	DJI - 69	RA% = 51%@50μM
	DJI - 70	RA% = 51%@50μM

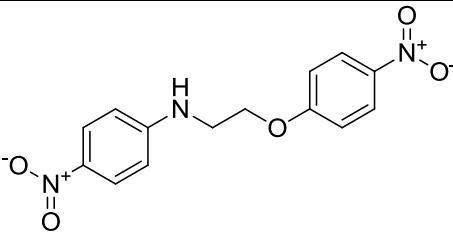
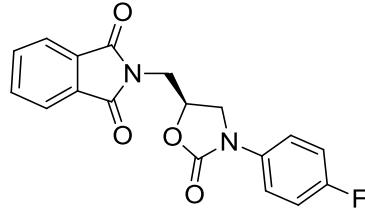
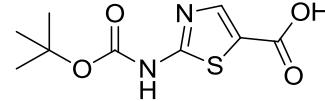
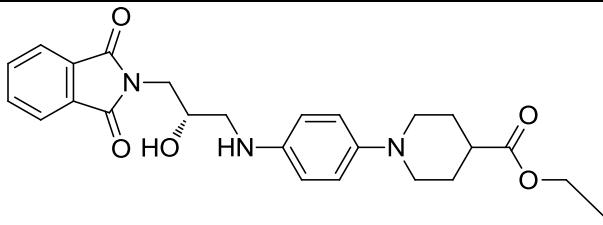
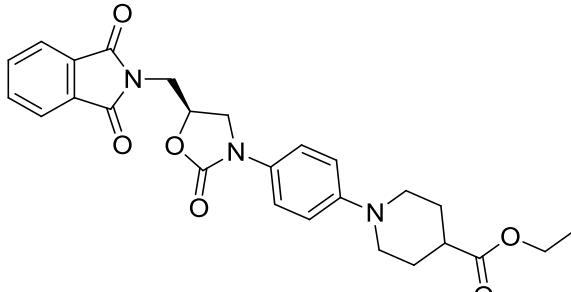
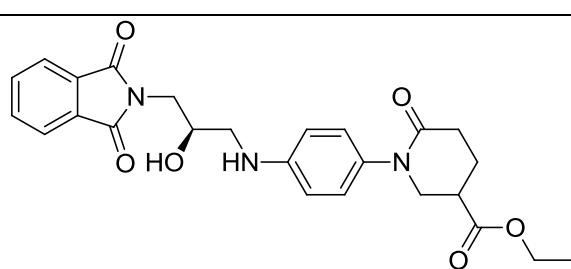
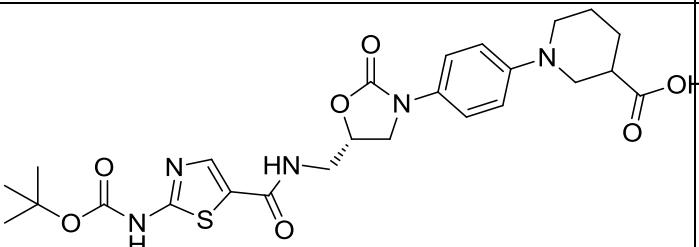
	DJI - 73	RA% = 48 , 47% @50μM
	DJI - 74	RA% = 96% @50μM
	DJI - 76	RA% = 99% @50μM
	DJI - 76 - 1	RA% = 133% @50μM
	DJI - 79	RA% = 92% @50μM
	DJI - 81	RA% = 77% @50μM
	DJI - 81a	RA% = 84% @50μM
	DJI - 82	RA% = 74, 49, 96 , 111% @50μM
	DJI - 83	RA% = 100 , 101% @50μM
	DJI - 86	RA% = 210, 104 , 64% @50μM

	DJI - 89	RA% = 91%@50μM
	DJI - 93	RA% = 98%@50μM
	DJI - 97	RA% = 66%@50μM
	DJI - 101	RA% = 124%@50μM
	DJI - 105	RA% = 73, 111%@50μM
	DJI - 110	RA% = 74%@50μM
	DJI - 111	RA% = 54%@50μM
	DJI - 112	RA% = 78%@50μM

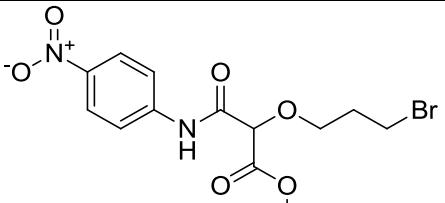
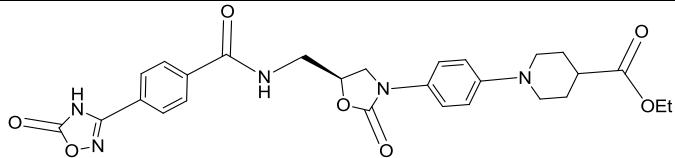
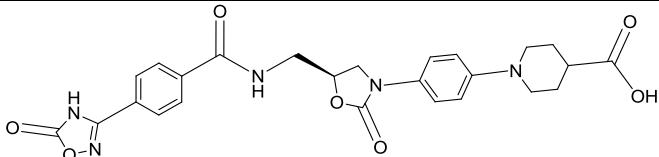
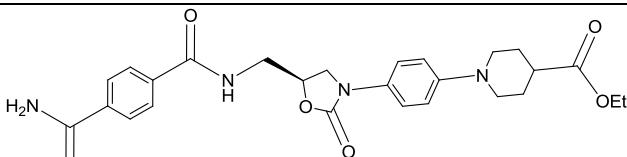
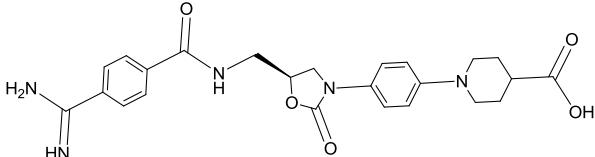
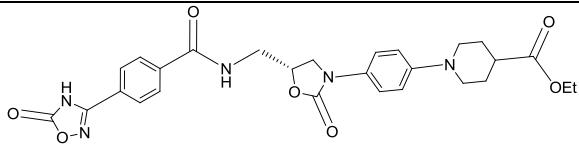
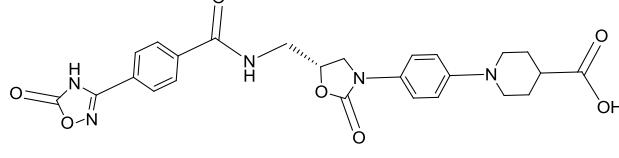
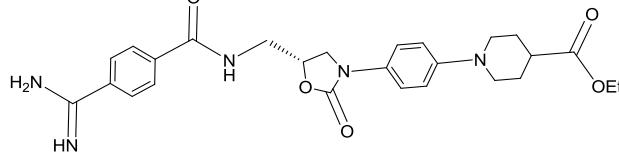
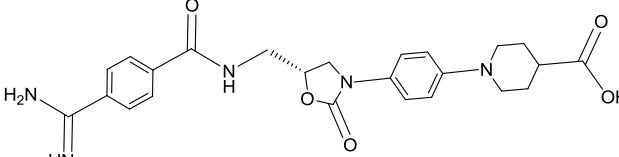
	DJI - 113	RA% = 75% @50μM
	DJI - 114	RA% = 95% @50μM
	DJI - 119	RA% = 83, 59% @50μM
	DJI - 401	RA% = 93% @50μM
	DJI - 402	RA% = 105% @50μM
	DJI - 404	RA% = 63% @50μM
	DJI - 408	RA% = 95% @50μM
	5A6	RA% = 86% @50μM

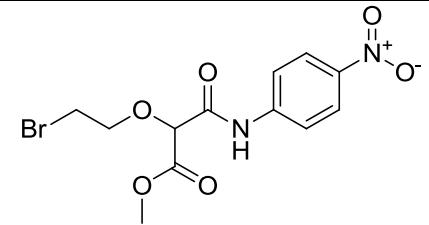
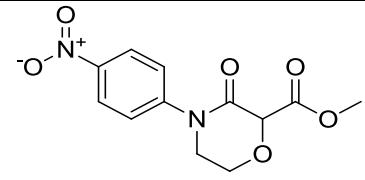
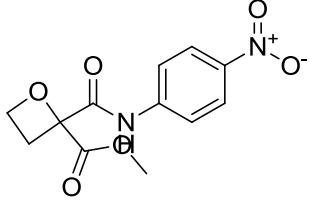
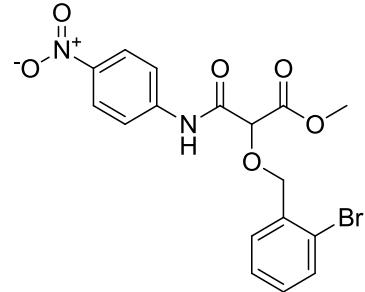
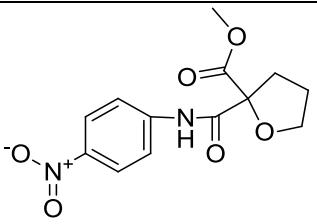
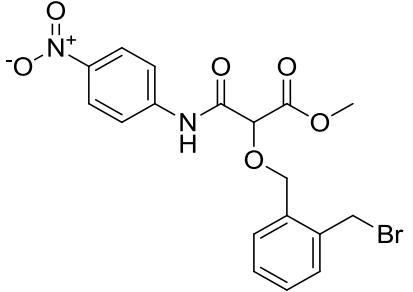
	6A8	RA% = 76%@50μM
	8C1	RA% = 127%@50μM
	5H2	RA% = 97%@50μM
	5F9	RA% = 104%@50μM
	DPS - 159	RA% = 108, 119%@50μM
	IKK - 01	RA% = 115%@50μM
	IKK - 02	RA% = 40%@50μM
	IKK - 03	RA% = 69%@50μM
	IKK - 04	RA% = 123%@50μM

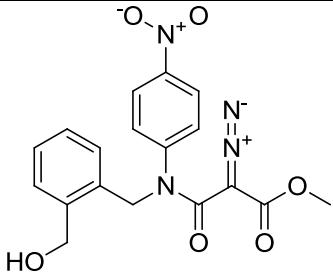
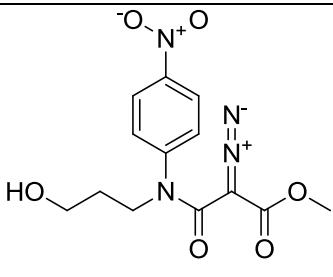
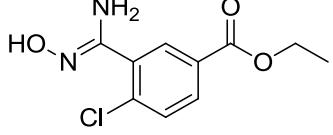
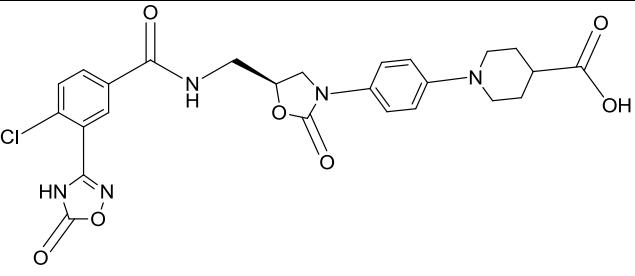
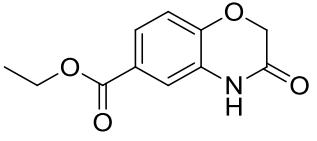
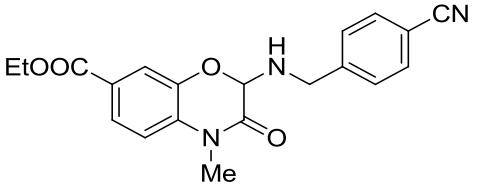
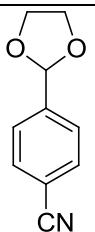
	IKK - 05	RA% = 95%@50μM
	IKK - 06	RA% = 97%@50μM
	IKK - 07	RA% = 132%@50μM
	IKK - 08	RA% = 103, 124%@50μM
	KUT - 15	RA% = 87%@50μM
	KUT - 59	RA% = 100%@50μM
	KUT - 62	RA% = 98%@50μM

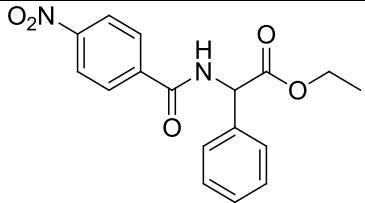
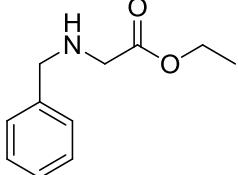
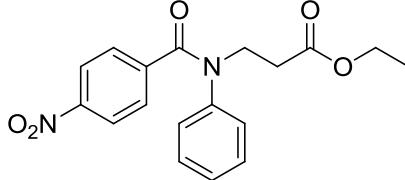
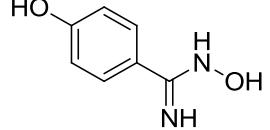
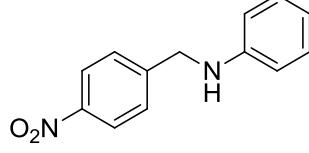
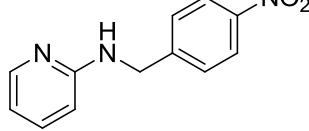
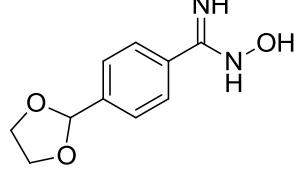
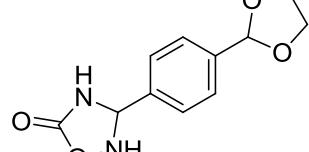
	KUT - 63	RA% = 99%@50μM
	KUT - 69	RA% = 94%@50μM
	KUT - 153	RA% = 101%@50μM
	KUT - 184	RA% = 86%@50μM
	KUT - 186	RA% = 66%@50μM
	KUT - 239	RA% = 82%@50μM
	KUT - 280	RA% = 88%@50μM

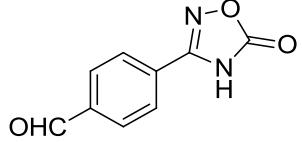
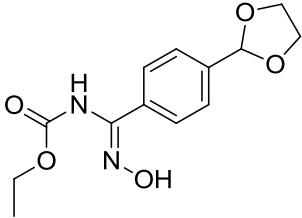
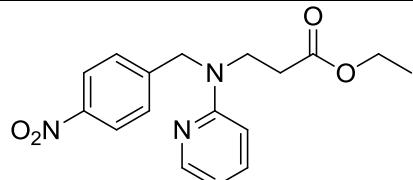
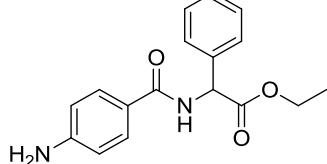
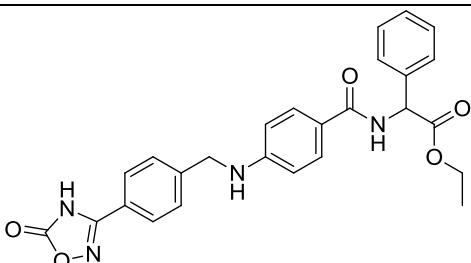
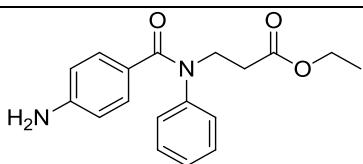
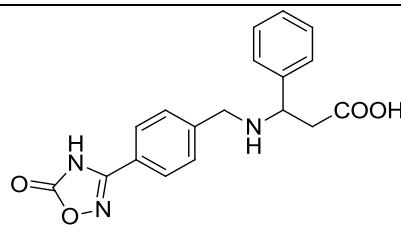
	KUT - 308	RA% = 63%@50μM
	KUT - 336	RA% = 72%@50μM
	KUT - 337	RA% = 45, 50%@50μM
	KUT - 344	RA% = 74%@50μM
	KUT - 426	RA% = 58%@50μM
	KUT - 432	RA% = 100%@50μM
	KUT - 441	RA% = 58%@50μM

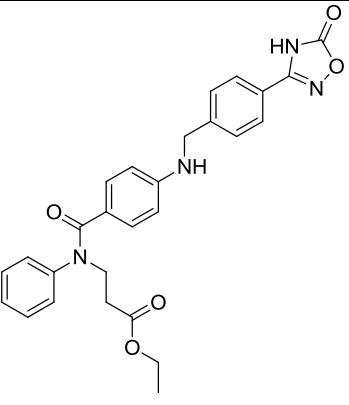
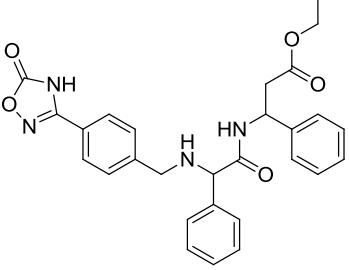
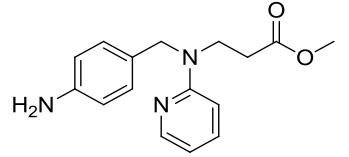
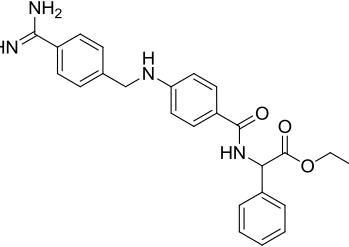
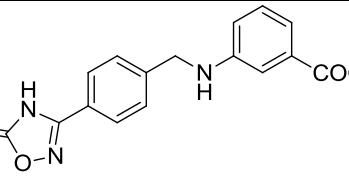
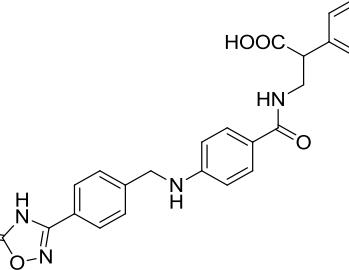
	KUT - 447	RA% = 85% @50μM
	KUT - 456	RA% = 95, 41 %@50μM
	KUT - 457	RA% = 72, 89% @50μM
	KUT - 458	RA% = 20% @50μM
	KUT - 459	RA% = 52, 128% @50μM
	KUT - 463	RA% = 103, 159% @50μM
	KUT - 464	RA% = 22, 134 %@50μM
	KUT - 465	RA% = 44, 115 %@50μM
	KUT - 466	RA% = 66, 69% @50μM

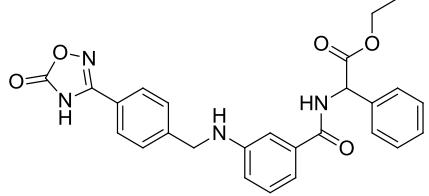
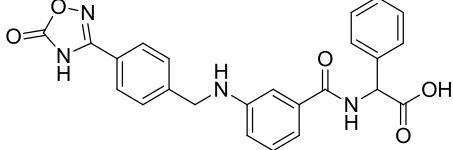
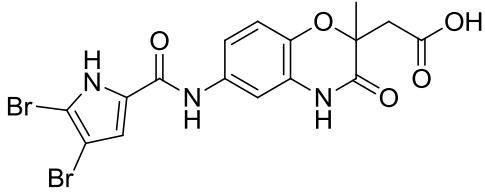
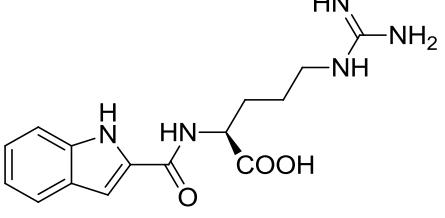
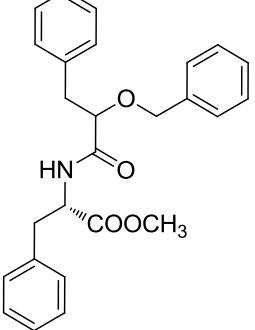
	KUT - 467	RA% = 86% @50μM
	KUT - 469	RA% = 90% @50μM
	KUT - 472	RA% = 61% @50μM
	KUT - 475	RA% = 88% @50μM
	KUT - 478	RA% = 96% @50μM
	KUT - 479	RA% = 32, 24 73% @50μM

	KUT - 485	RA% = 85%@50μM
	KUT - 492	RA% = 62, 56%@50μM
	KUT - 498	RA% = 63%@50μM
	KUT - 503	RA% = 55, 163%@50μM
	DZJ - 14	RA% = 173%@50μM
	DZJ - 19	RA% = 101%@50μM
	DNN - 1	RA% = 102%@50μM

	DNN - 2	RA% = 72% @50μM
	DNN - 3	RA% = 72% @50μM
	DNN - 4	RA% = 74% @50μM
	DNN - 5	RA% = 56% @50μM
	DNN - 6	RA% = 74,86% @50μM
	DNN - 11	RA% = 80% @50μM
	DNN - 12	RA% = 81% @50μM
	DNN - 13	RA% = 16, 69, 142, 72% @50μM 89% @ μM
	DNN - 14	RA% = 75% @50μM

	DNN - 19	RA% = 101, 50, 47%@50μM
	DNN - 20	RA% = 74%@50μM
	DNN - 21	RA% = 64%@50μM
	DNN - 23	RA% = 62%@50μM
	DNN - 24	RA% = 87%@50μM
	DNN - 25	RA% = 60%@50μM
	DNN - 27	RA% = 66%@50μM

	DNN - 28	RA% = 42, 78, 23 %@50μM
	DNN - 33	RA% = 61% @50μM
	DNN - 34	RA% = 85% @50μM
	DNN - 37	RA% = 63, 73% @50μM
	DNN - 38	RA% = 80% @50μM
	DNN - 39	RA% = 81% @50μM

	DNN - 40	RA% = 42, 90, 102%@50μM
	DNN - 43	RA% = 53%@50μM
	KJP - 05	RA% = 69%@50μM
	IVK - 10	RA% = 91%@50μM
	IVK - 16a	RA% = 59%@50μM
	F/31	RA% = 111%@50μM
	A/56a	RA% = 70%@50μM
	M/130	RA% = 70%@50μM
	C/18a	RA% = 82%@50μM