

**LOSCHMIDT  
LABORATORIES**



# **Využití molekulového modelování k inženýrství proteinů a hledání aktivních látek**

Mgr. Jan Brezovský, Ph.D.

Loschmidtovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a RECETOX, MU

- ❑ **Molekulové modelování**
- ❑ **Inženýrství proteinů**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - Příklady
- ❑ **Hledání aktivních látek**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - Příklady
- ❑ **Shrnutí**



## ❑ **Molekulové modelování**

### ❑ **Inženýrství proteinů**

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

### ❑ **Hledání aktivních látek**

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

### ❑ **Shrnutí**

- “Teoretická či výpočetní technika, která nám poskytne vhled do chování molekulárního systému.”
  
- **využití**
  - analýza struktury proteinů a předpověď jejich funkce
  - předpověď dynamiky a stability proteinů
  - předpověď interakcí mezi ligandem a proteinem či více proteiny
  - předpověď reakčních bariér a mechanismů enzymů
  - předpověď struktury nových proteinů a enzymů

## □ popis pomocí

- výpočetní geometrie
- molekulové mechaniky
- kvantové mechaniky

## □ typické metody

- geometrické metody
- molekulové dokování
- molekulová dynamika
- kvantová chemie
- *de novo* design
- ...

- Molekulové modelování
- **Inženýrství proteinů**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - Příklady
- **Hledání aktivních látek**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - Příklady
- **Shrnutí**

- **cíl: úprava struktury proteinu za účelem zlepšení vybraných vlastností**
  
- **tři hlavní přístupy**
  - racionální design
  - řízená evoluce
  - semi-racionální design

# Proteinové inženýrství

## RACIONÁLNÍ DESIGN

### 1. Počítačové modelování



### 2. Místně cílená mutagenese



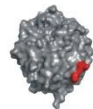
Samostatný mutovaný gen

### 3. Transformace

### 4. Exprese proteinu

### 5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*



Zkonstruovaný mutantní enzym

**VYLEPŠENÝ  
ENZYM**

### 7. Biochemické testování

## ŘÍZENÁ EVOLUCE

1. *není aplikováno*

### 2. Náhodná mutagenese



Knihovna mutovaných genů  
( >10,000 klonů )

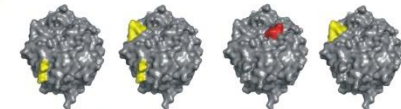
### 3. Transformace

### 4. Exprese proteinu

5. *není aplikována*

### 6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



Vybrané mutantní enzymy



# Proteinové inženýrství

	Řízená evoluce	Semi-rationální design	Racionální design
Vysokoprostupný screening/selekce	zásadní	výhodou, ale není třeba	není třeba
Strukturní anebo funkční informace	není třeba	kterákoliv postačí	obě zásadní
Prozkoumání sekvenčního prostoru	rozsáhlé a náhodné	průměrné a cílené	omezené
Šance nalézt synergistické mutace	nízká	vysoká	průměrná

# Semi-racionální design

- ❑ kombinuje výhody **racionálního a náhodného** přístupu
- ❑ výběr slibných míst **“hot-spoty”** k mutagenezi → tvorba tzv. **“smart libraries”**
- ❑ založené na **znalosti** struktury či funkce proteinu
- ❑ 😊 vysokopropustný screening běžně není potřeba
- ❑ 😊 zvýšená šance získat varianty s požadovanými vlastnostmi
- ❑ 😞 požaduje jistou znalost strukturně-funkčních vztahu modifikovaného proteinu, 😊 ale ne příliš detailní

# Racionální design

- ❑ **místně-cílené** změny ve struktuře cílového proteinu
- ❑ pár aminokyselinových substitucí, pro které je predikováno zlepšení cílových vlastností
- ❑ založeno na **detailních znalostech** struktury, funkce a mechanismu proteinu
- ❑ 😊 relativně snadná charakterizace navržených variant
- ❑ ☹️ komplexita strukturně-funkčních vztahu proteinů
- ❑ ☹️ požadavek na zkušenosti s molekulovým modelováním



## ❑ Molekulové modelování

## ❑ **Inženýrství proteinů**

- Typické přístupy
- **Metody modelování**
- Příklady

## ❑ Hledání aktivních látek

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

## ❑ Shrnutí

# Modelování pro semi-racionální design

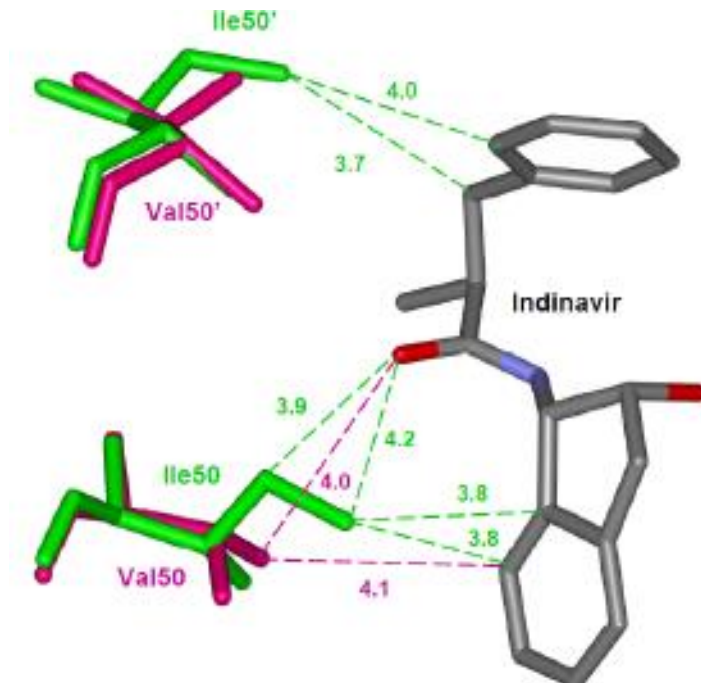
- identifikace relevantních residuů jako hot-spotů pro vylepšení
  - stability
  - katalytických vlastností

# Hot-spoty pro vylepšení katalytických vlastností

- residua účastnící se vazby substrátů, stabilizace tranzitního stavu či transportu substrátů-produktů → mutace pak mohou vylepšit či narušit vazbu, katalýzu či transport
  - residua tvořící **interakce s ligandem**
  - residua tvořící **vazebnou kapsu**
  - residua tvořící **transportní tunely**

# Analýza protein-ligand interakcí

- vizualizace struktury protein-ligand komplexu
  - experimentální struktury (wwPDB)
  - molekulové dokování
  - nástroje: Pymol, LigPlot, PDBSum, ...



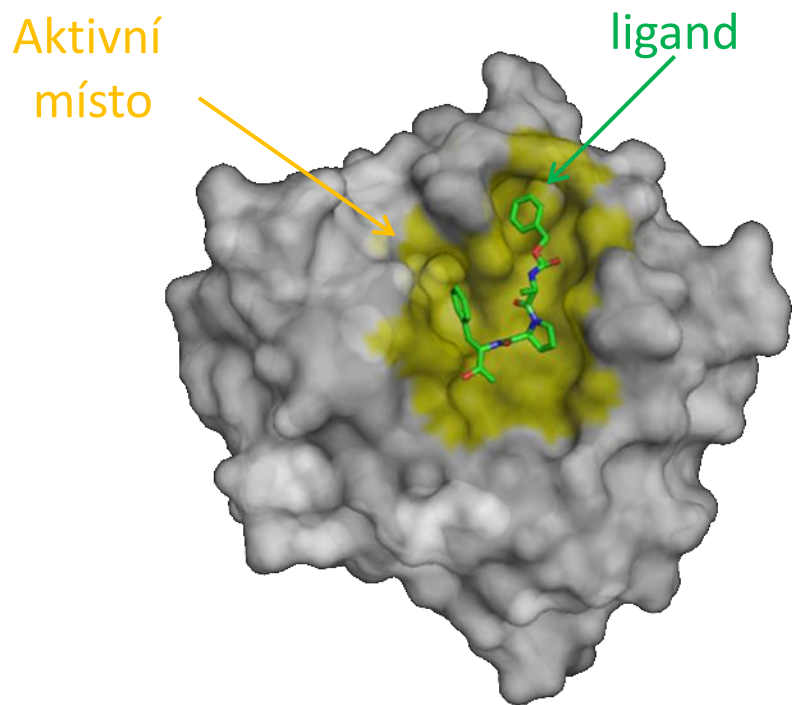
# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v **kapsách, kavitách či žlábcích** struktury.
  - většina residuí v těchto kapsách/kavitách může během katalytického cyklu přijít do kontaktu s ligandem
- je možné vybrat residua která pravděpodobně budou interagovat s ligandem i bez znalosti komplexu



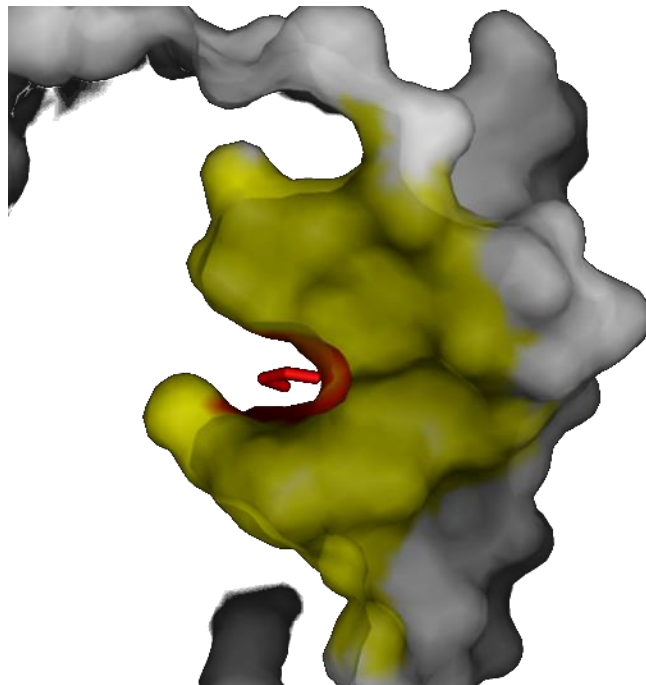
# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.



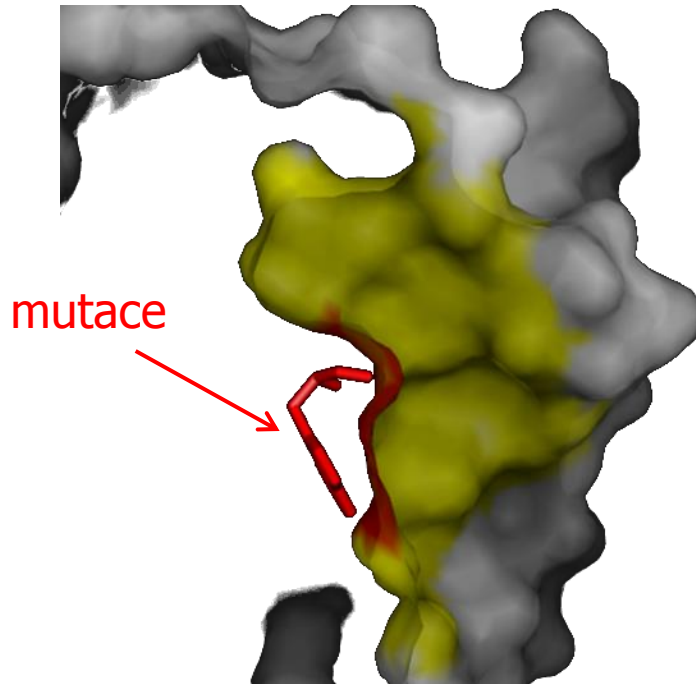
# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.



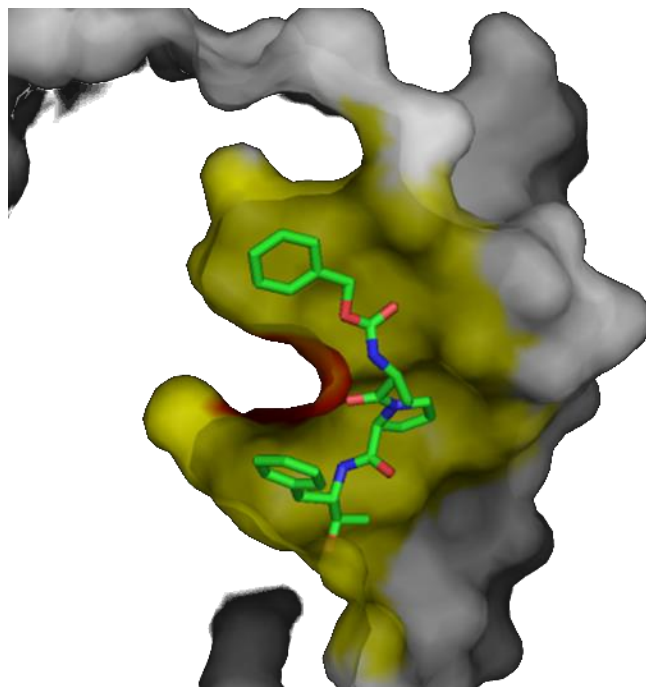
# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.



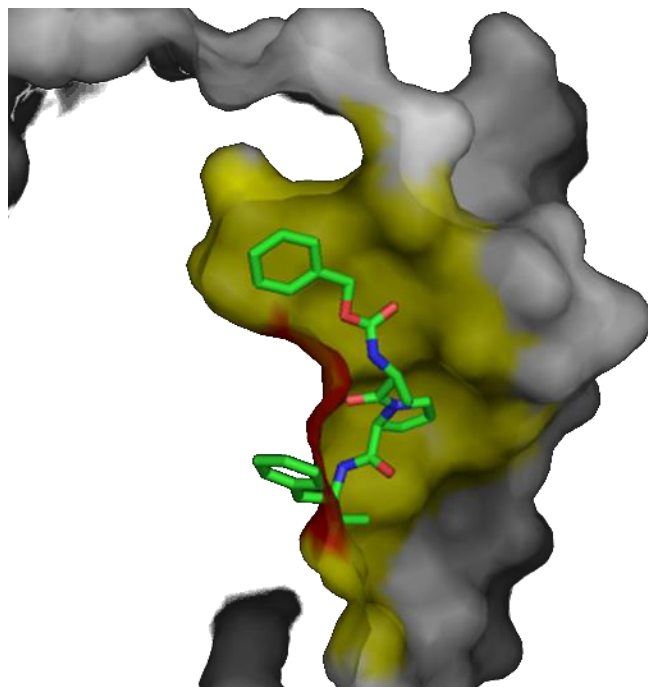
# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.



# Analýza funkčních kapes

- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.

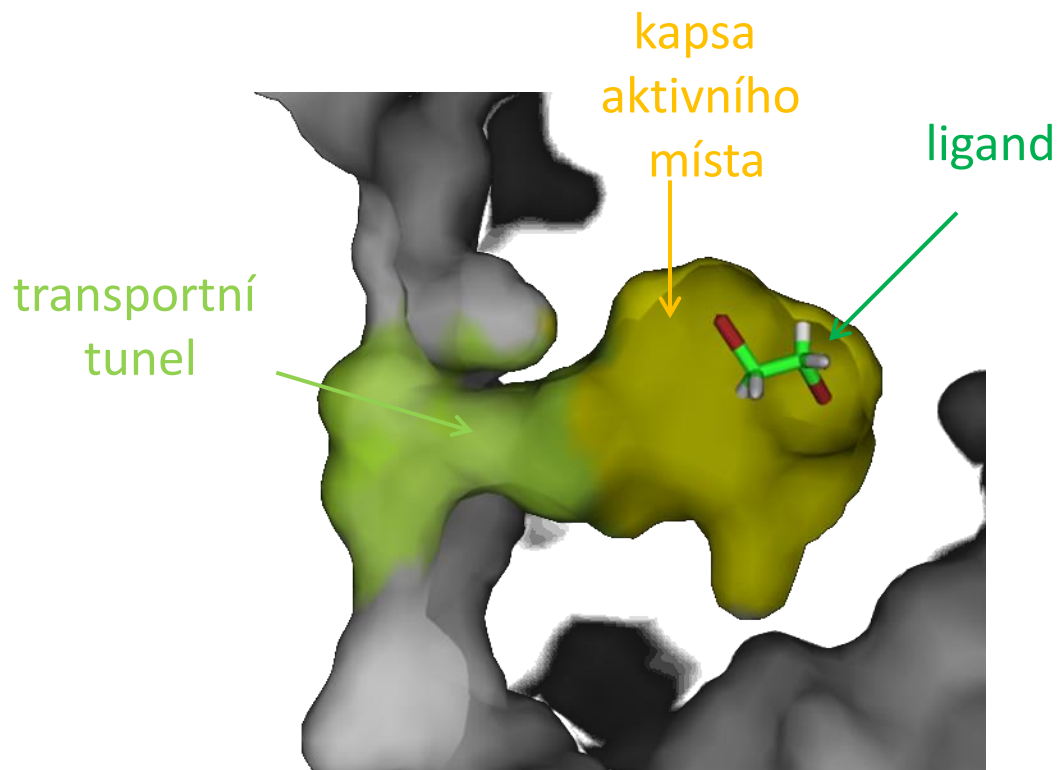


# Analýza transportních tunelů

- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí **transportních tunelů**
  - umožňují selektivní transport molekul
  - jejich mutace může urychlit či omezit transport nativních ligandů či umožnit transport nových ligandů

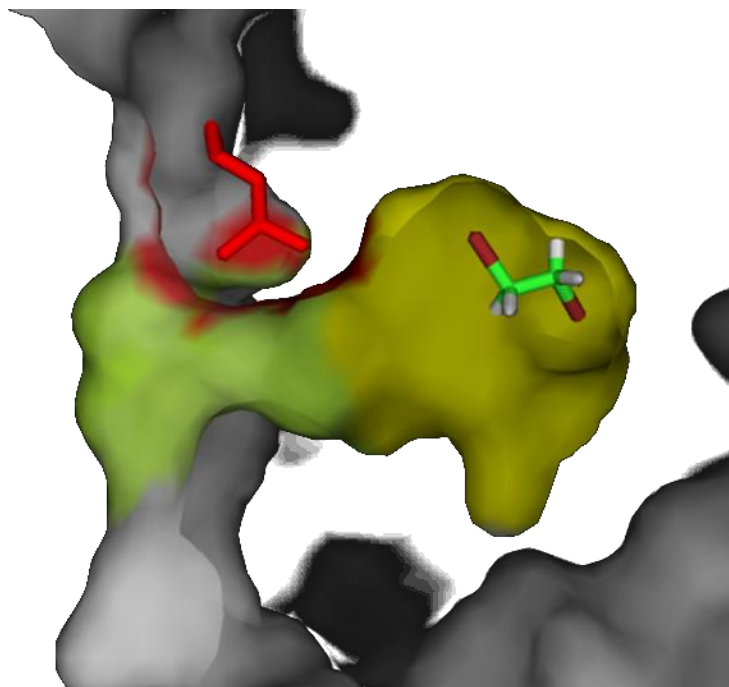
# Analýza transportních tunelů

- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí transportních tunelů



# Analýza transportních tunelů

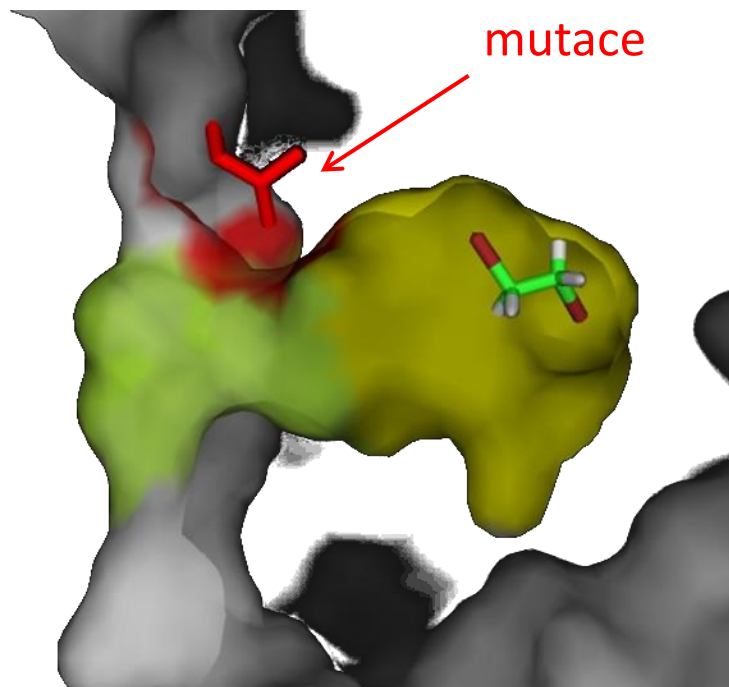
- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí transportních tunelů





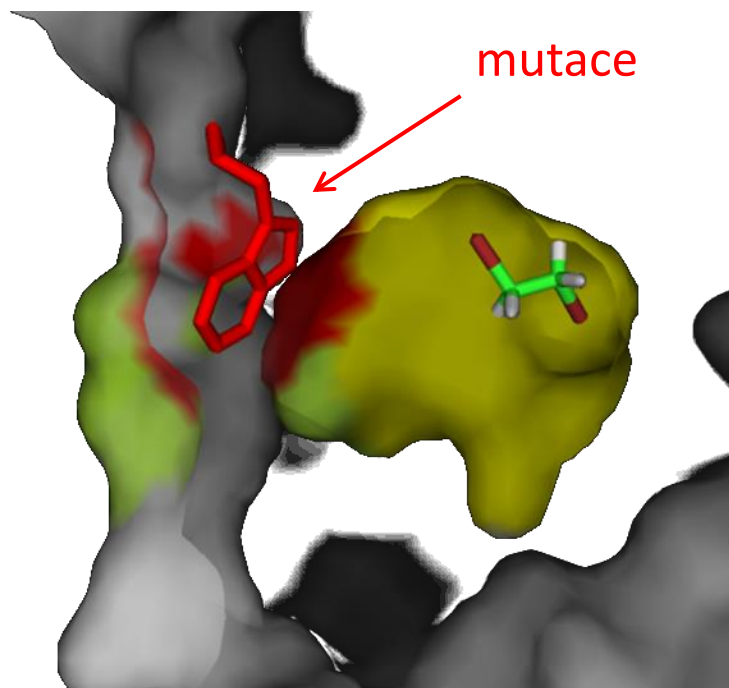
# Analýza transportních tunelů

- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí transportních tunelů

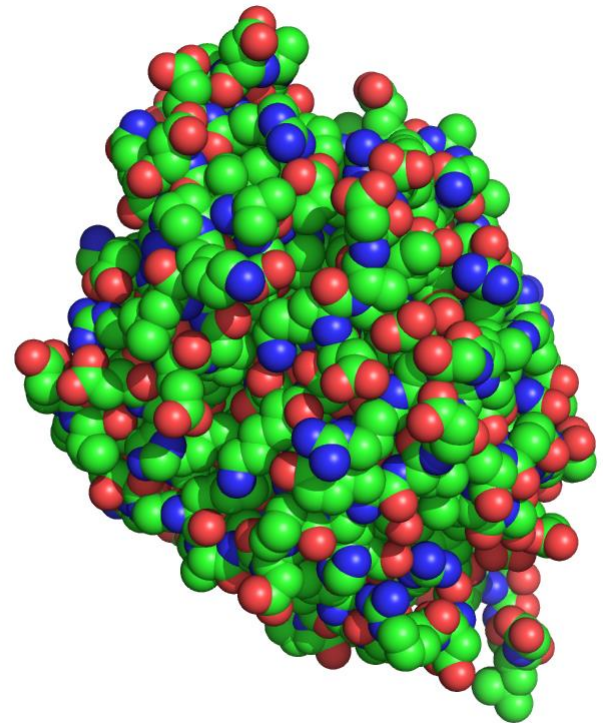


# Analýza transportních tunelů

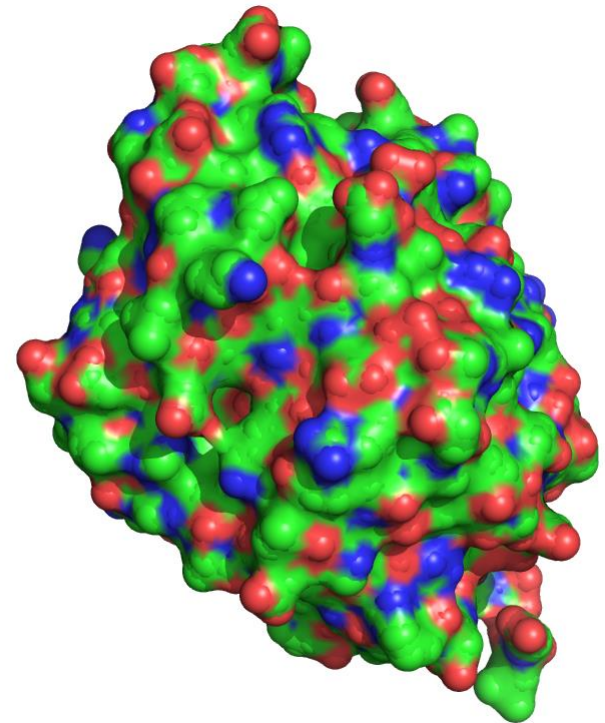
- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí transportních tunelů



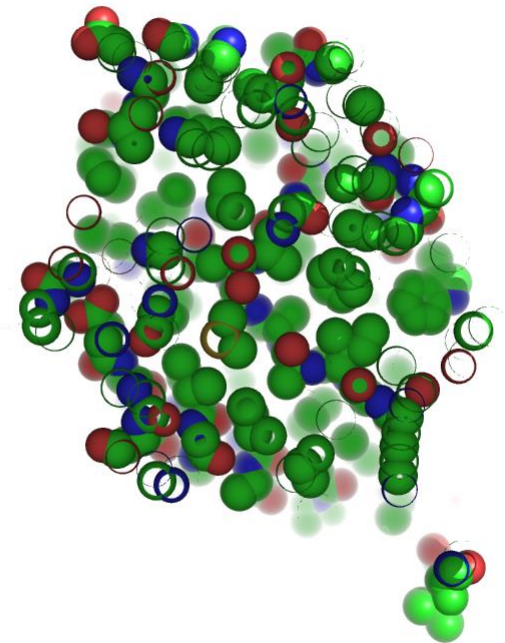
- **studium geometrie proteinů**
  - netriviální - struktura proteinů je velmi členitá



- **studium geometrie proteinů**
  - netriviální - struktura proteinů je velmi členitá

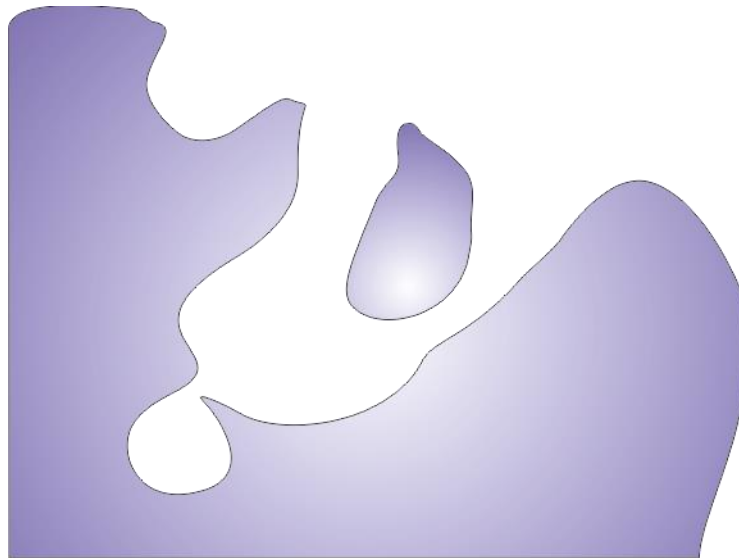


- **studium geometrie proteinů**
  - netriviální - struktura proteinů je velmi členitá



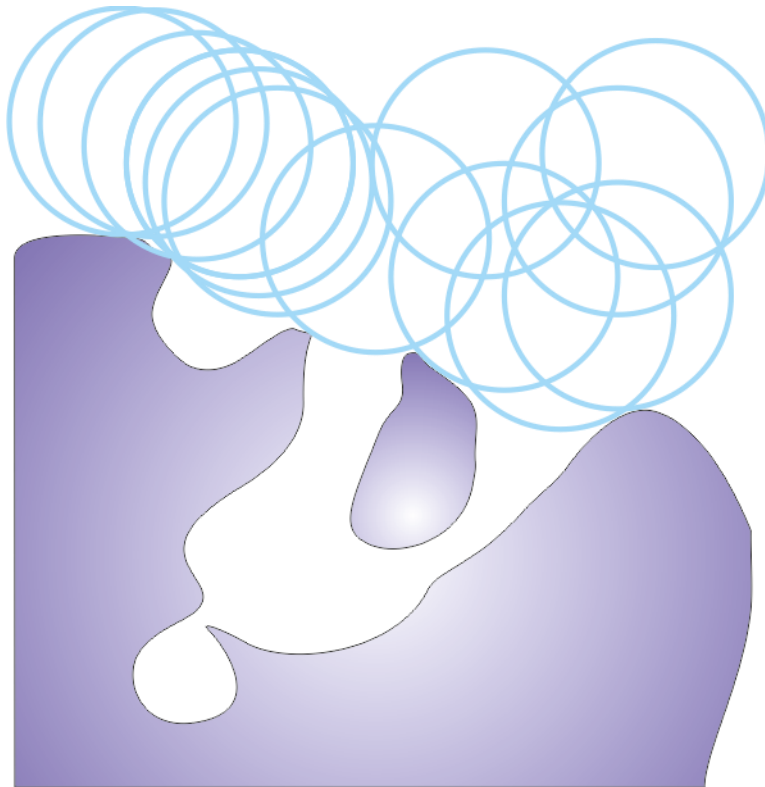
# Identifikace kapes a dutin

- **přístupnost prostoru sondám o rozdílné velikosti**
  - kavity, kapsy či žlábkky
  - nástroje: **3V**, HOLLOW, LIGSITE, PASS, SURFNET či **fpocket**



# Identifikace kapes a dutin

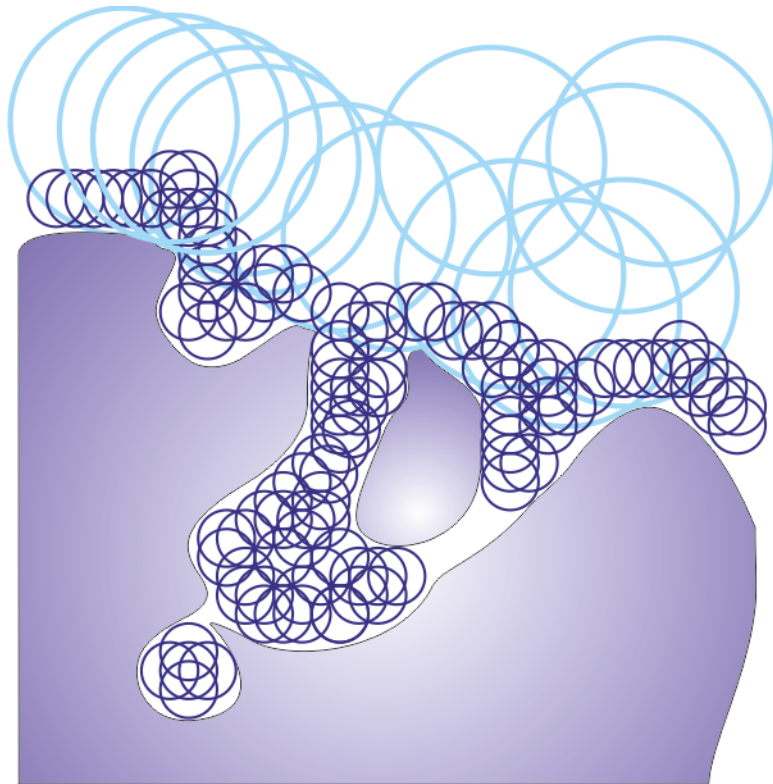
- **přístupnost prostoru sondám o rozdílné velikosti**
  - kavity, kapsy či žlábký
  - nástroje: **3V**, HOLLOW, LIGSITE, PASS, SURFNET či **fpocket**





# Identifikace kapes a dutin

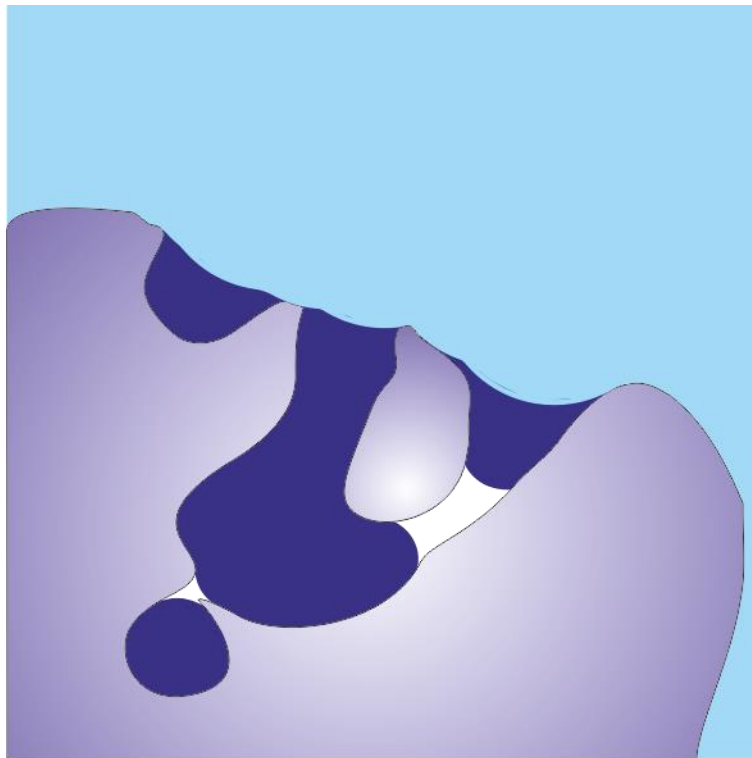
- **přístupnost prostoru sondám o rozdílné velikosti**
  - kavity, kapsy či žlábký
  - nástroje: **3V**, HOLLOW, LIGSITE, PASS, SURFNET či **fpocket**





# Identifikace kapes a dutin

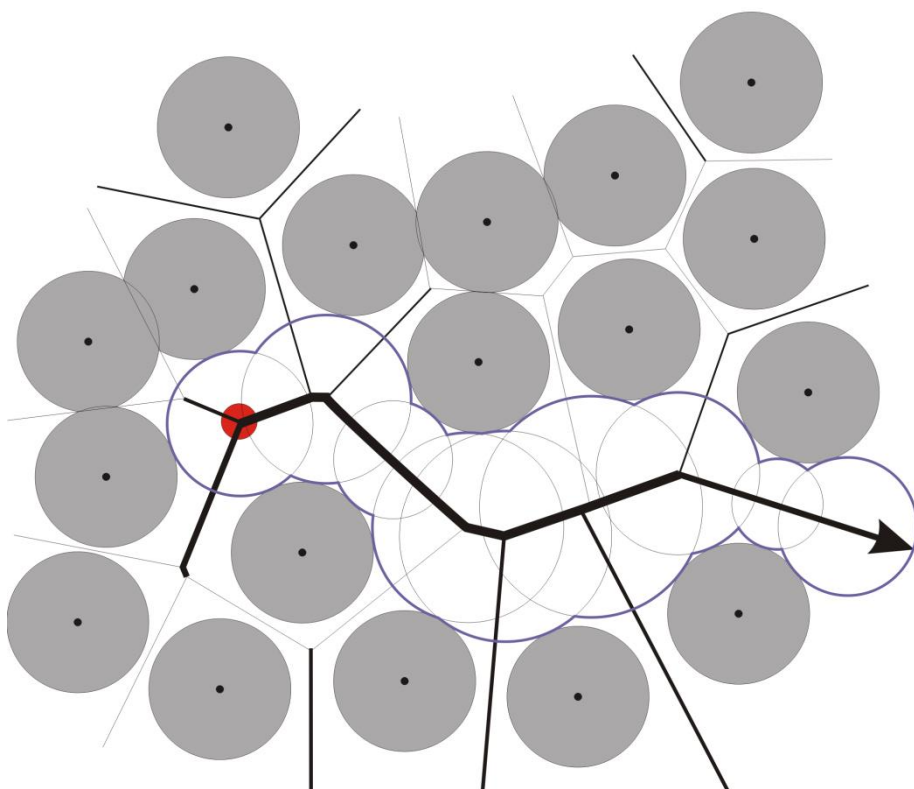
- **přístupnost prostoru sondám o rozdílné velikosti**
  - kavity, kapsy či žlábký
  - nástroje: **3V**, HOLLOW, LIGSITE, PASS, SURFNET či **fpocket**



# Identifikace tunelů

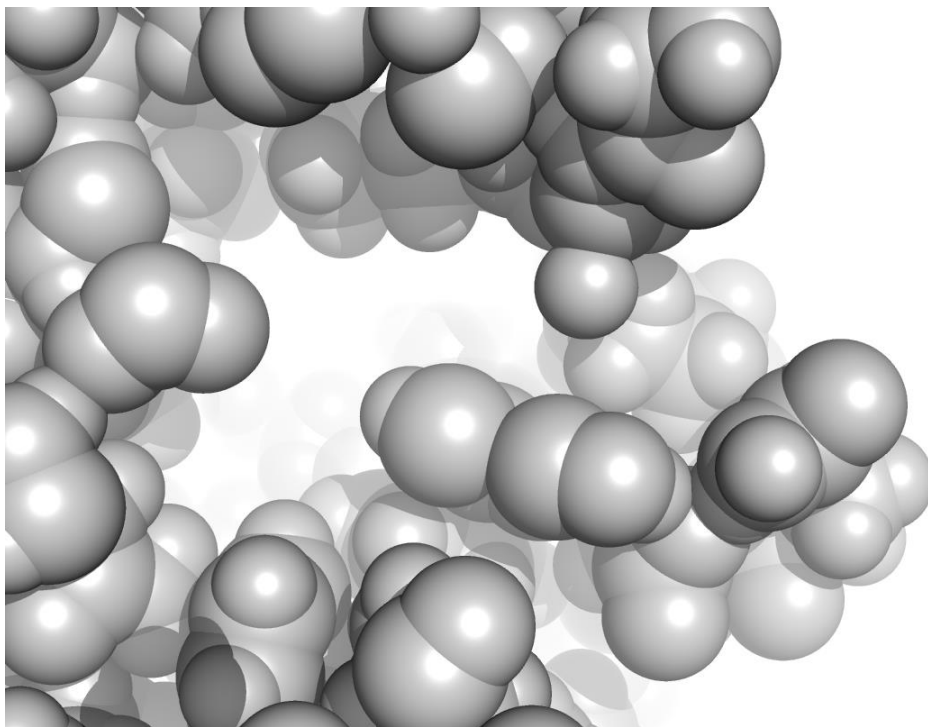
## □ grafové algoritmy

- transportní cesty
- nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



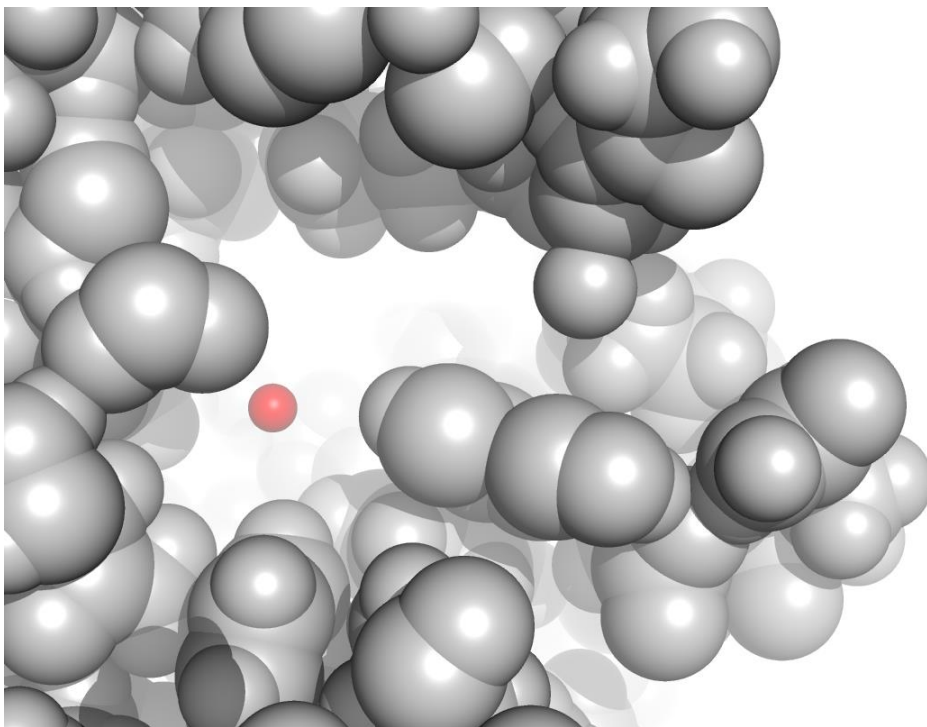
# Identifikace tunelů

- **grafové algoritmy**
  - transportní cesty
  - nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



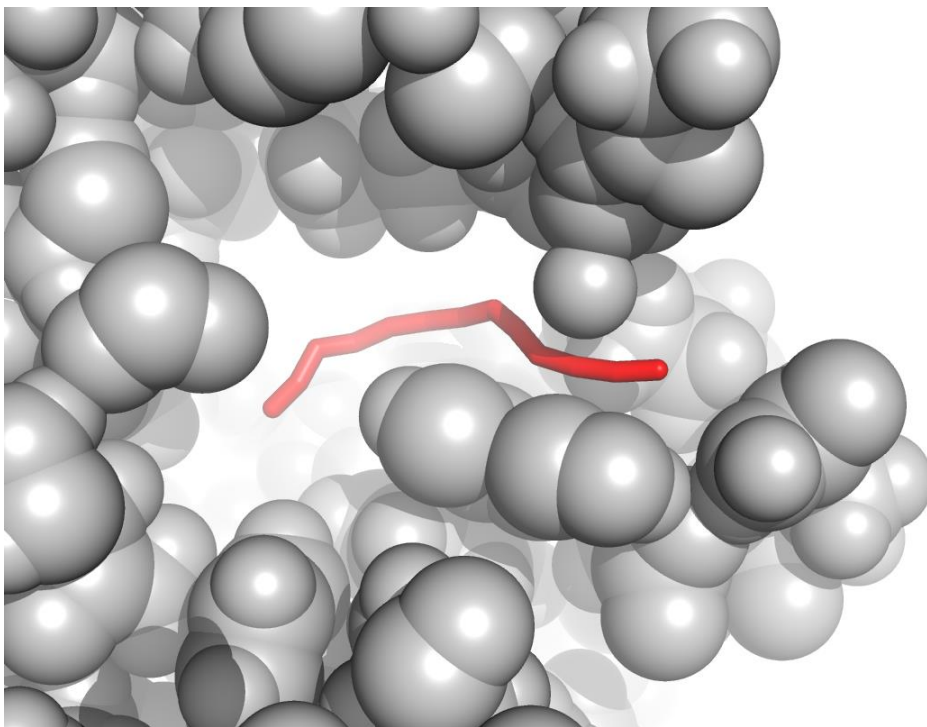
# Identifikace tunelů

- **grafové algoritmy**
  - transportní cesty
  - nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



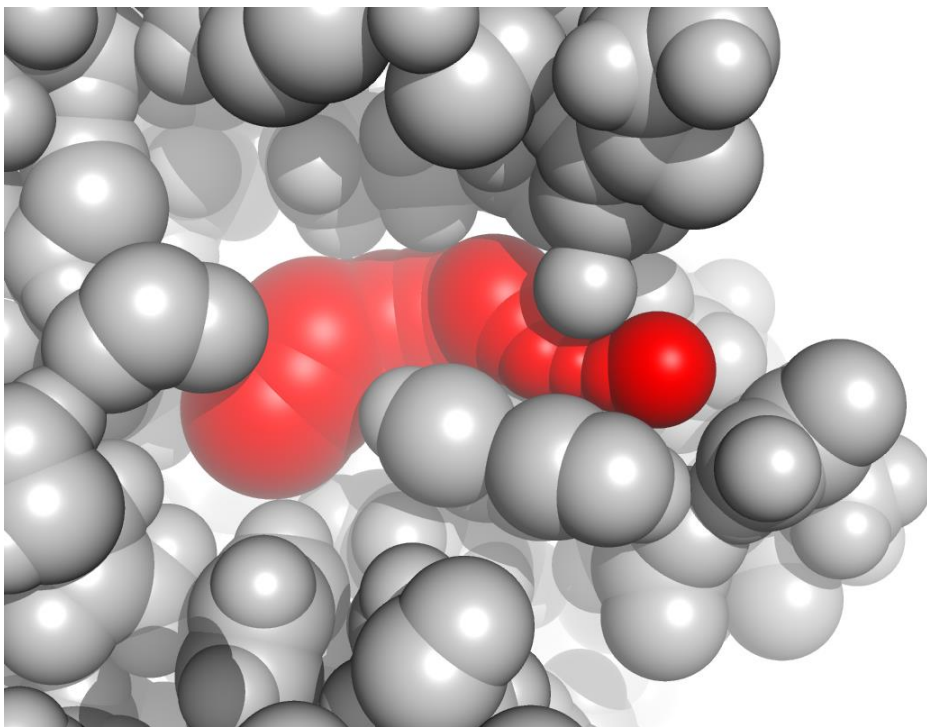
# Identifikace tunelů

- **grafové algoritmy**
  - transportní cesty
  - nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



# Identifikace tunelů

- **grafové algoritmy**
  - transportní cesty
  - nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



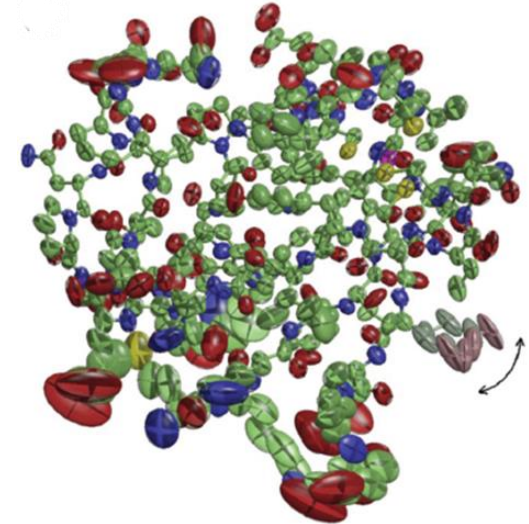
# Hot-spoty pro vylepšení stability

- ❑ **velmi flexibilní residua** – zanesení residuí která strukturu znehyní
- ❑ **residua v transportních tunelech**

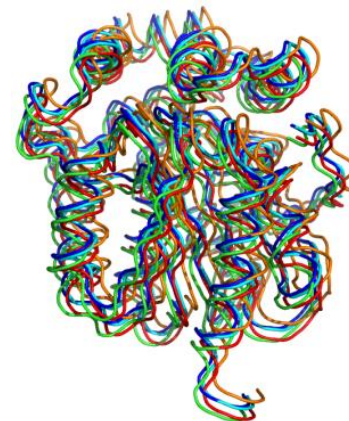


# Identifikace flexibilních residuí

- z krystalografie pomocí **termálních B-factors**
  - odpovídají úrovni termálního pohybu atomů



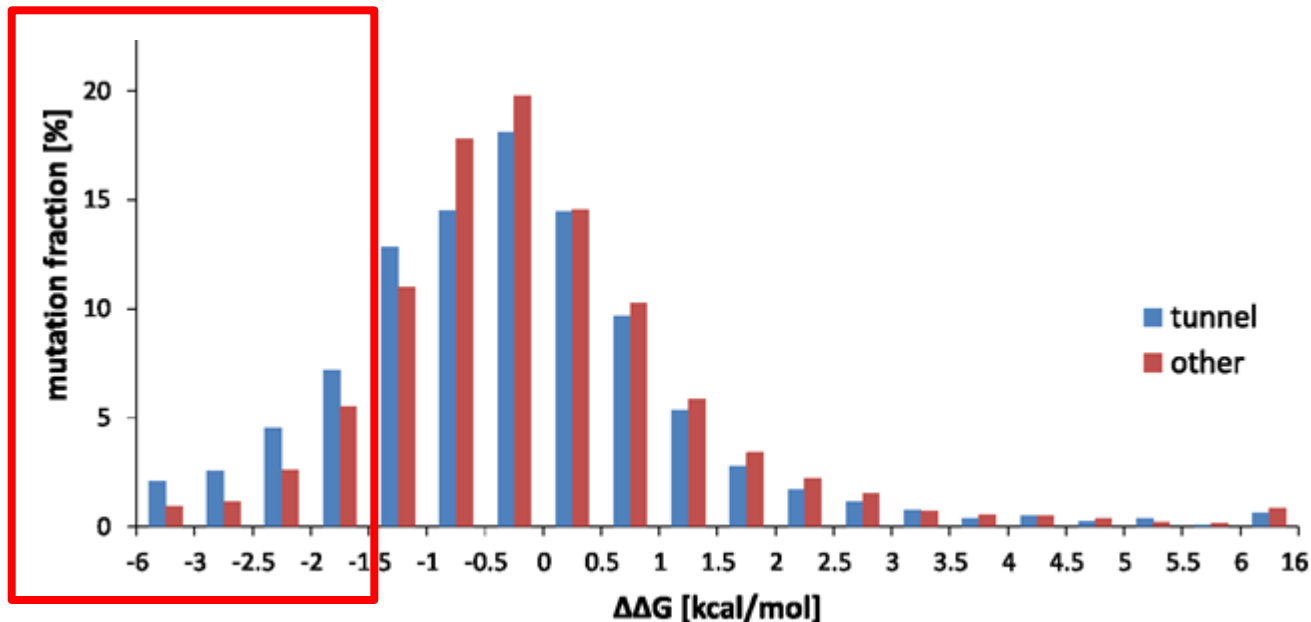
- **analýzou ansámblu** z NMR či molekulové dynamiky





# Resiuda v tunelech

- saturační mutagenéze v tunelových residuích s 2× vyšší pravděpodobností povede k signifikantnímu nárůstu stability než mutagenéze v jiných oblastech proteinu

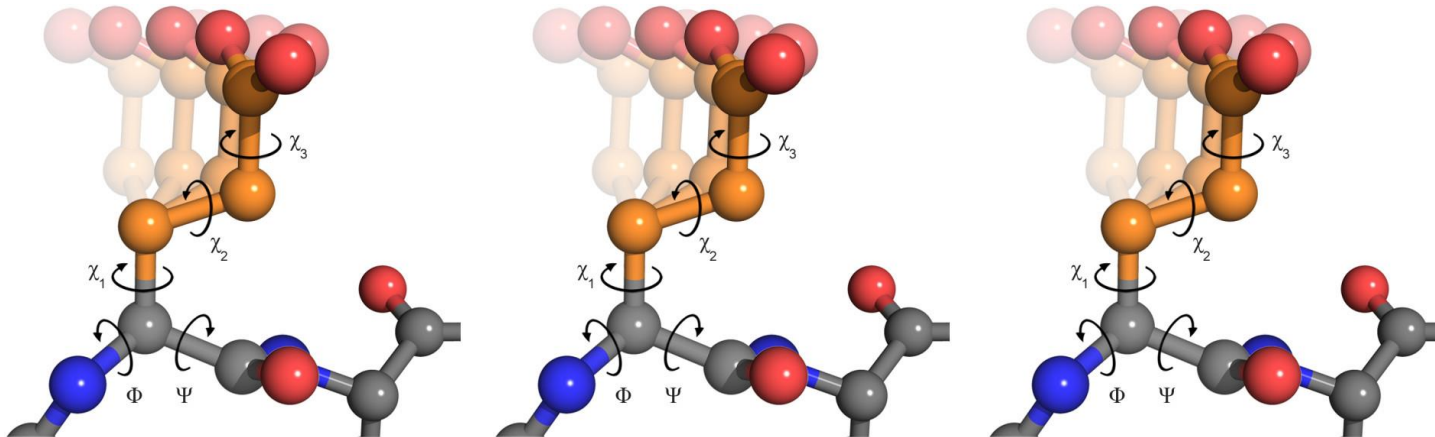


- ❑ **základem je predikce struktury modifikovaného proteinu**
- ❑ **následně je hodnocen vlivu mutace na**
  - stabilitu
  - katalytické vlastnosti

# Predikce struktury mutantního proteinu

## □ princip

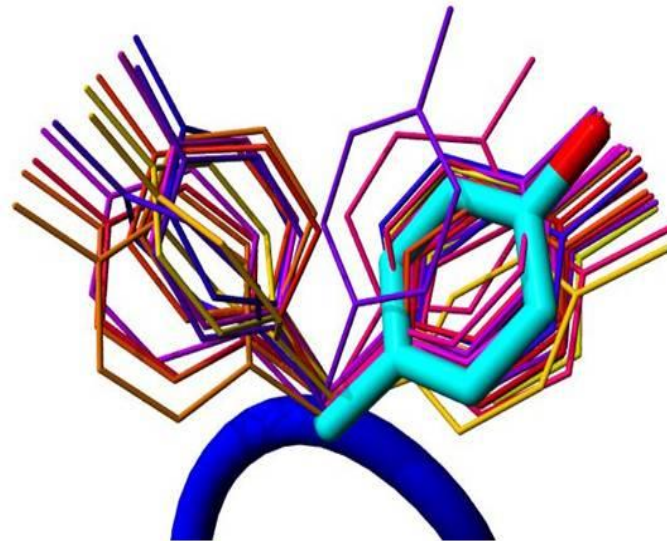
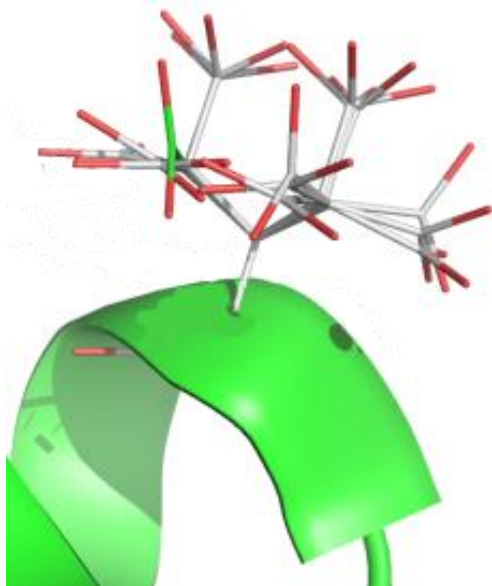
- mutované residuum je potřeba vložit do struktury v optimální konformaci vzhledem k jeho okolí a současně upravit konformace okolích residuí v důsledku mutace tak aby struktura měla co nejnižší energii – **těžký kombinatorický problém**



# Predikce struktury mutantního proteinu

## □ řešení

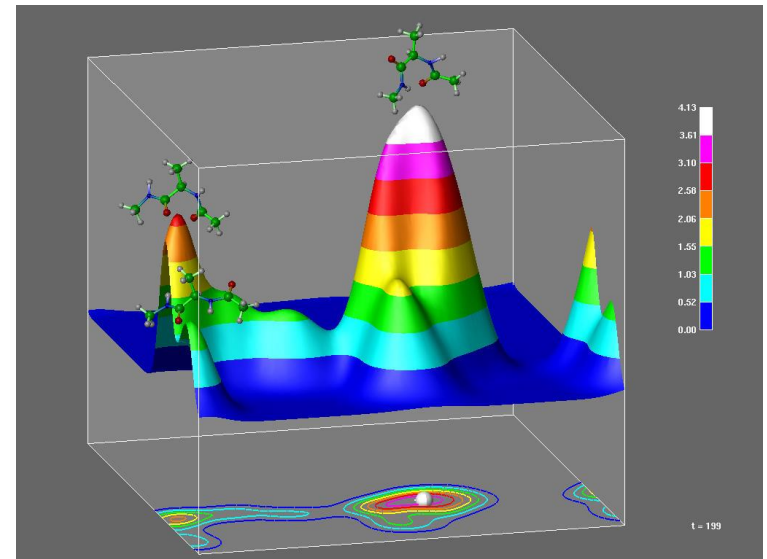
- reprezentace reziduí pomocí knihovny rotamerů (konformace běžně pozorované v sáde kvalitních X-ray struktur)



# Predikce struktury mutantního proteinu

## □ řešení

- výběr navzájem kompatibilní sady rotamerů probíhá stochasticky (Monte Carlo či genetické algoritmy) dle energie přiřazené zjednodušeným silovým polem
- často kombinováno z minimalizací energie



# Predikce stability mutantního proteinu

## □ změna energie divokého typu a mutantu

- silové pole
- empirické skórovací funkce
- strojové učení

## □ vhodné nástroje

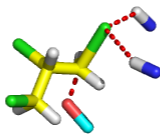
- FoldX
- ERIS
- Rosetta
- ...

# Predikce vlivu mutace na funkci proteinu

- ❑ **změna vazebné energie ligandu**
  - molekulový doking + molekulová dynamika
- ❑ **změna reakční bariéry/mechanismu**
  - kvantová chemie či QM/MM molekulová dynamika
- ❑ **změna rychlosti/mechanismu transportu**
  - grafové algoritmy, molekulová dynamika, ...

# De novo design enzymů

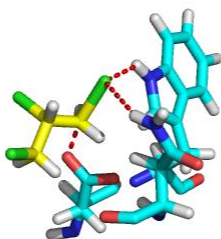
- **cíl: predikovat strukturu stabilizující transiční stav reakce**
  - definice theozymu – substrát v TS a nezbytné funkční skupiny





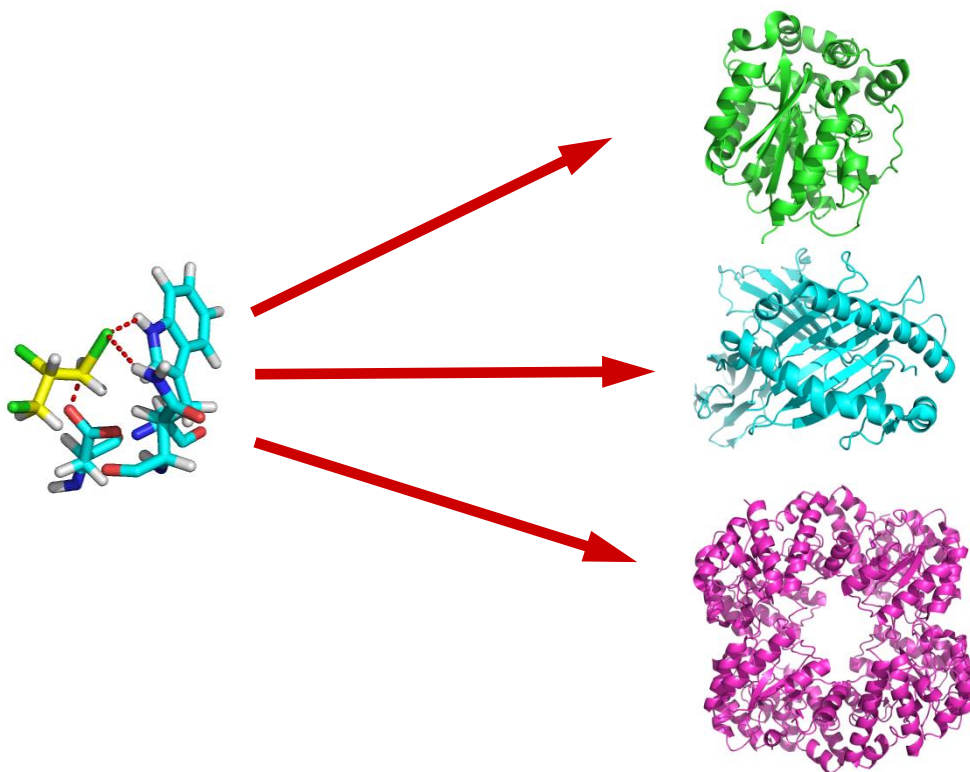
# De novo design enzymů

- **cíl: predikovat strukturu stabilizující transiční stav reakce**
  - výběr všech potenciálních katalytických residuů a jejich rotamerů odpovídající theozymu



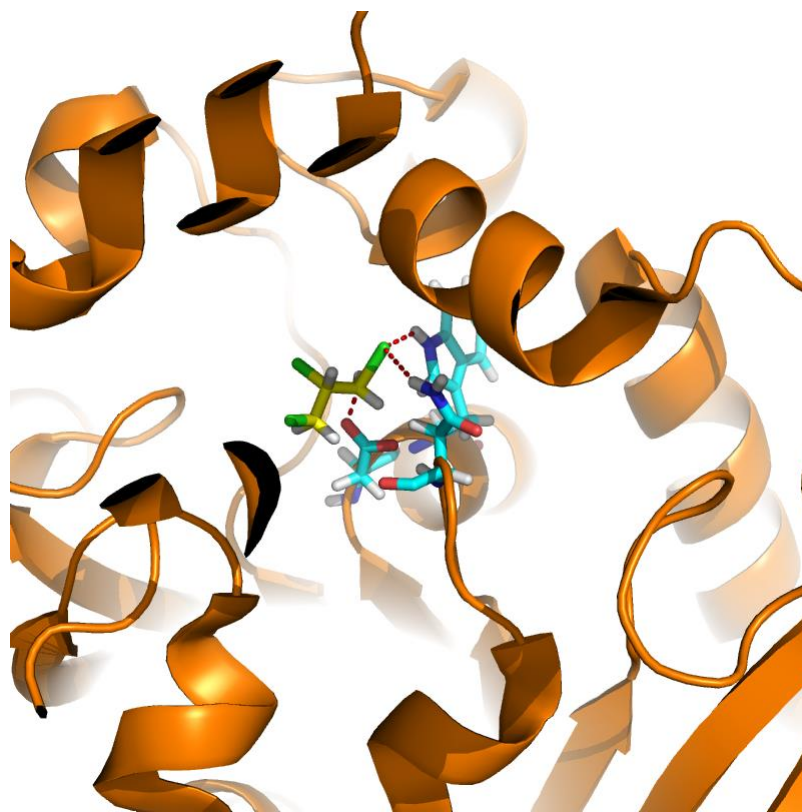
# De novo design enzymů

- **cíl: predikovat strukturu stabilizující transiční stav reakce**
  - nalezení vhodného proteinového foldu kompatibilního s vybranými katalytickými residui



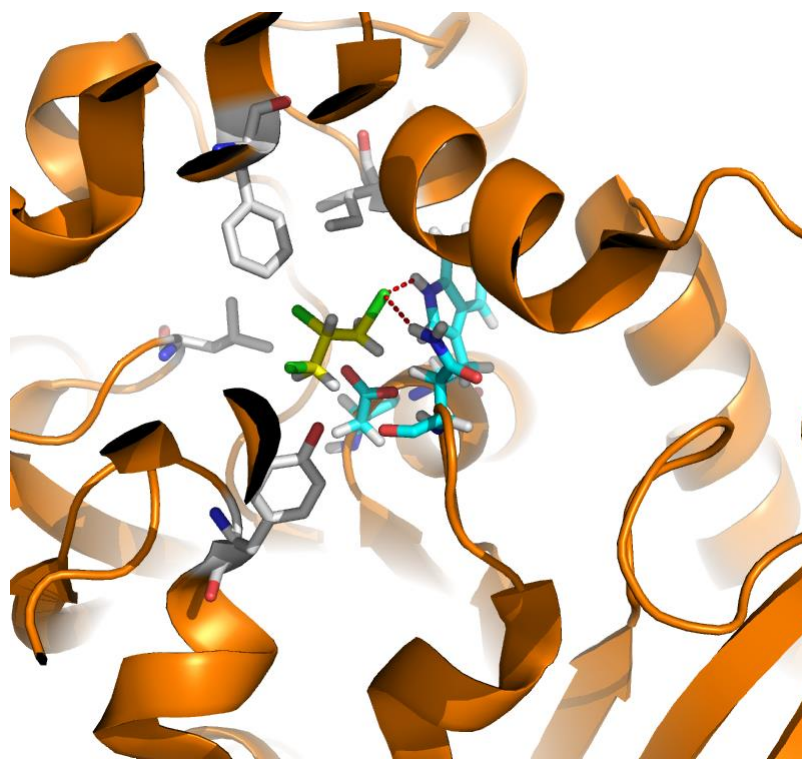
# De novo design enzymů

- **cíl: predikovat strukturu stabilizující transiční stav reakce**
  - transplantace katalytických aminokyselin do vybraného foldu



# De novo design enzymů

- **cíl: predikovat strukturu stabilizující transiční stav reakce**
  - nalezení optimální kombinace okolních aminokyselin stabilizujících aktivní místo

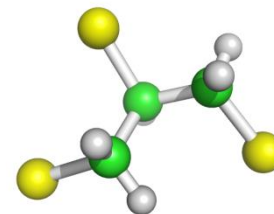


- Molekulové modelování
- **Inženýrství proteinů**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - **Příklady**
- **Hledání aktivních látek**
  - Typické přístupy
  - Metody modelování
  - Příklady
- **Shrnutí**

# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## ☐ **TCP – persistentní organický polutant**

- toxický, karcinogéní
- vedlejší produkt chemického průmyslu
- kontaminuje podzemní vody



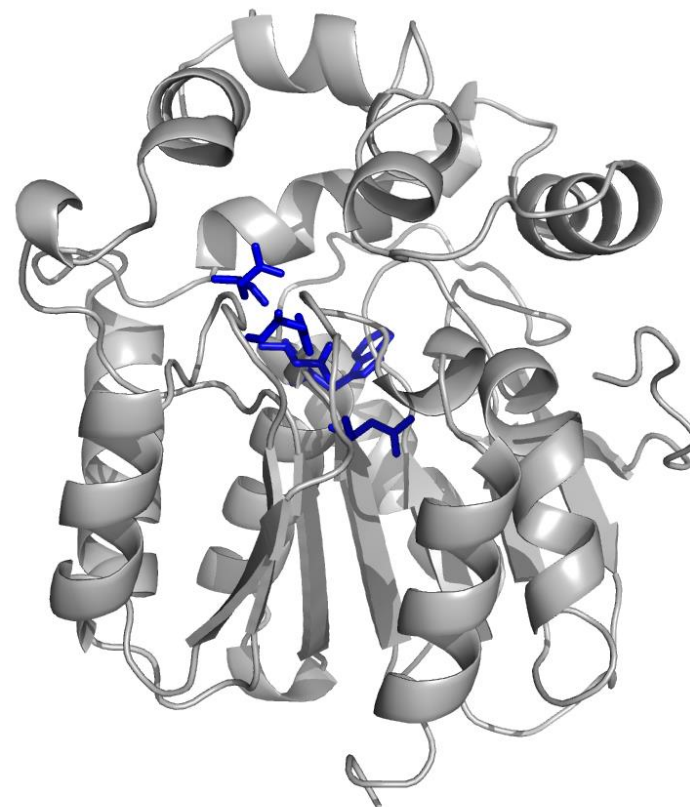
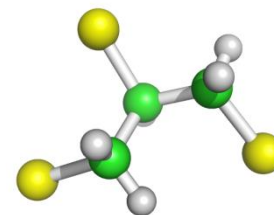
# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## ☐ TCP – persistentní organický polutant

- toxický, karcinogéní
- vedlejší produkt chemického průmyslu
- kontaminuje podzemní vody

## ☐ enzym DhaA je schopen konverze

- $k_{\text{cat}} = 0.08 \text{ s}^{-1}$
- aktivita nedostatečná pro aplikace

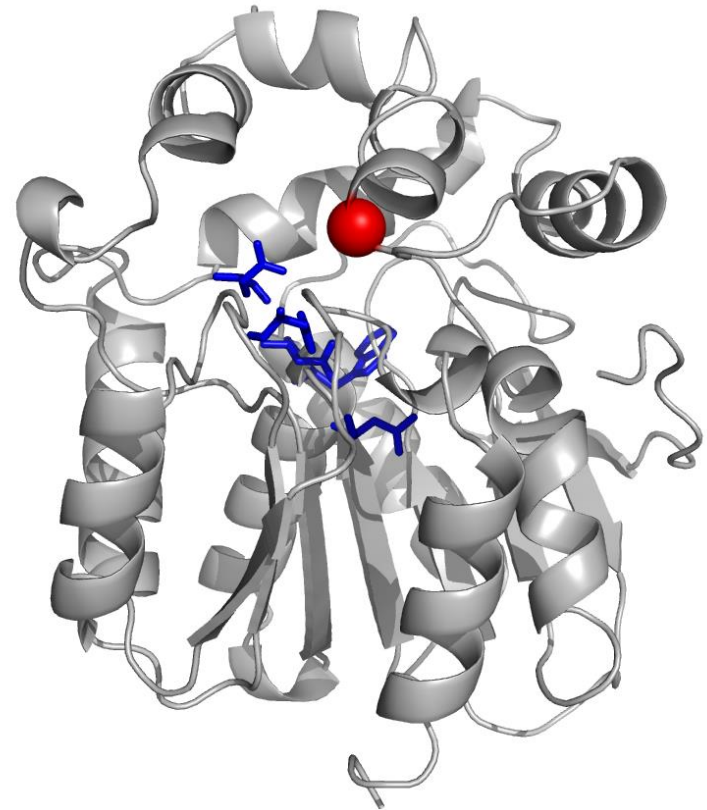




# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## □ mutanti na pozici 176

- C176Y:  $k_{\text{cat}} = 0.28 \text{ s}^{-1}$
- C176F:  $k_{\text{cat}} = 0.32 \text{ s}^{-1}$



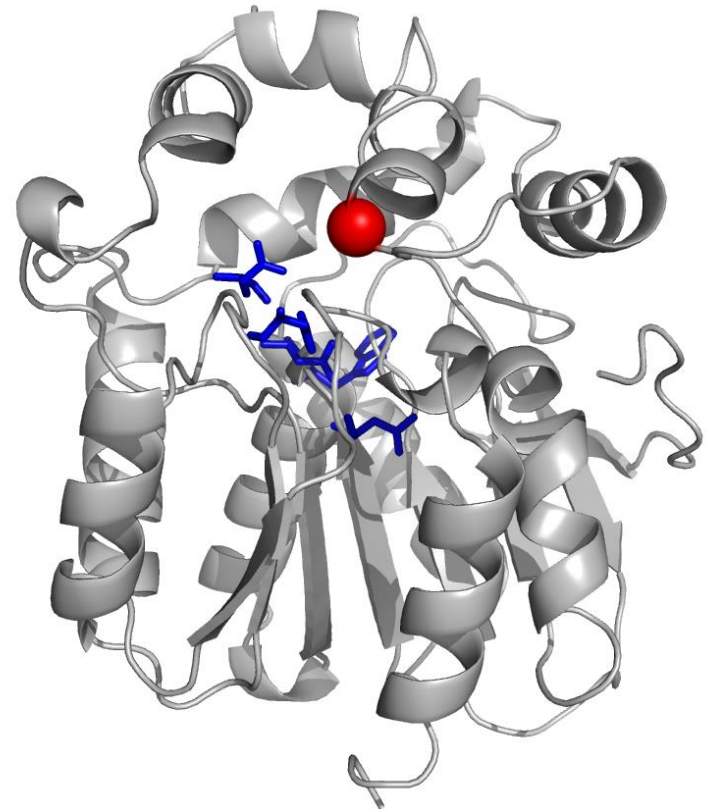
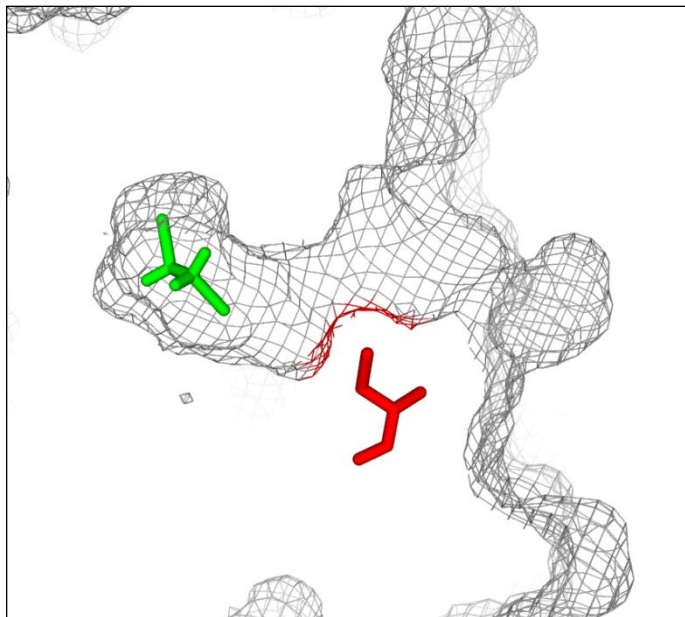


# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## ❑ mutanti na pozici 176

- C176Y:  $k_{\text{cat}} = 0.28 \text{ s}^{-1}$
- C176F:  $k_{\text{cat}} = 0.32 \text{ s}^{-1}$

## ❑ mechanismus -> modifikace tunelu

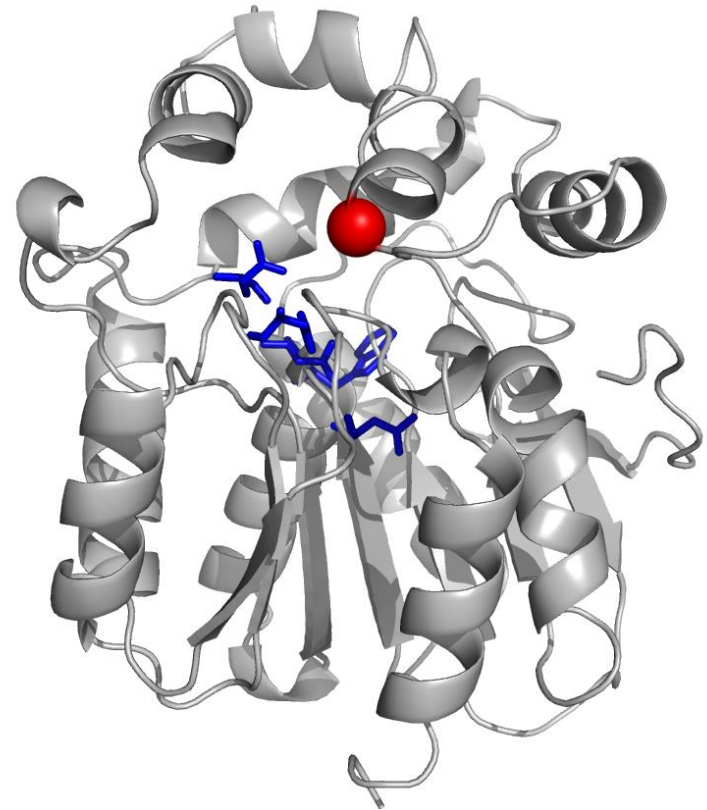
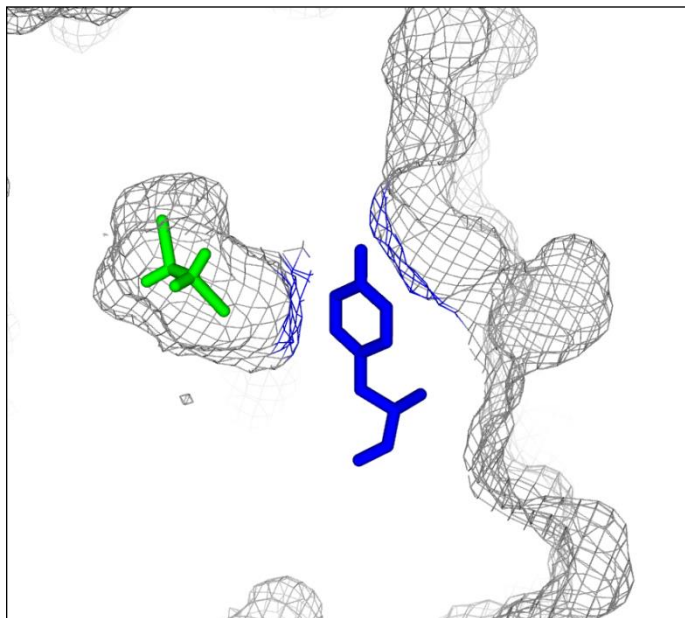


# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## ❑ mutanti na pozici 176

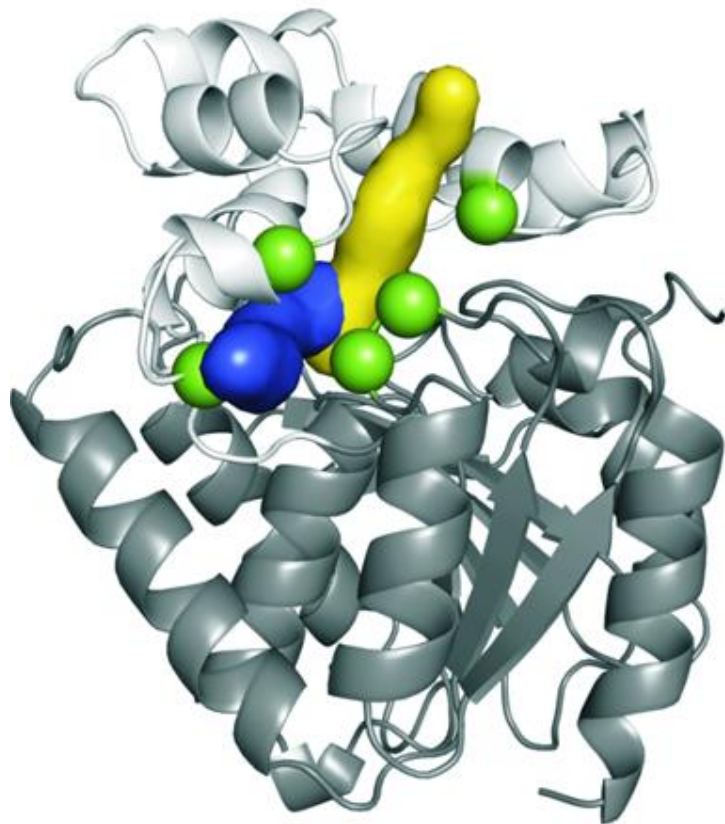
- C176Y:  $k_{\text{cat}} = 0.28 \text{ s}^{-1}$
- C176F:  $k_{\text{cat}} = 0.32 \text{ s}^{-1}$

## ❑ mechanismus -> modifikace tunelu



# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

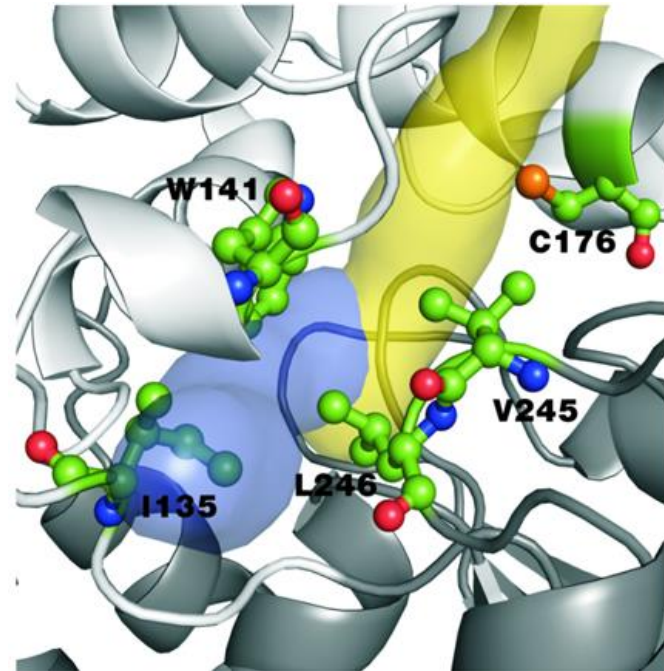
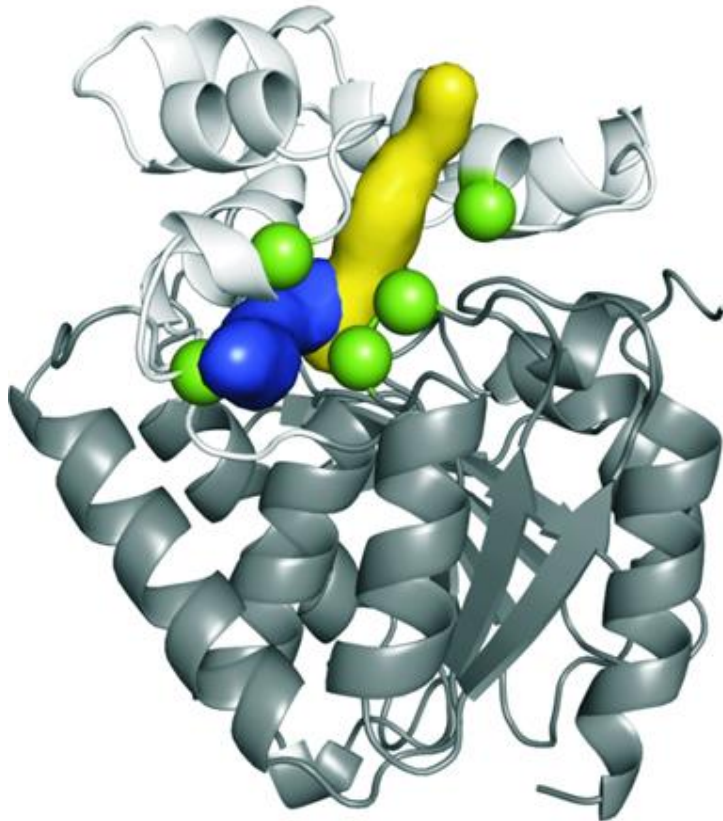
- **design dalších mutantů**
  - identifikace všech relevantních tunelů a jejich modifikace



# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## □ design dalších mutantů

- identifikace všech relevantních tunelů a jejich modifikace



# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

- ❑ **výsledný enzym DhaA31**
  - 5 bodový mutant
  - $k_{\text{cat}} = 1.26 \text{ s}^{-1}$
- ❑ **přístupové tunely uzavřené**



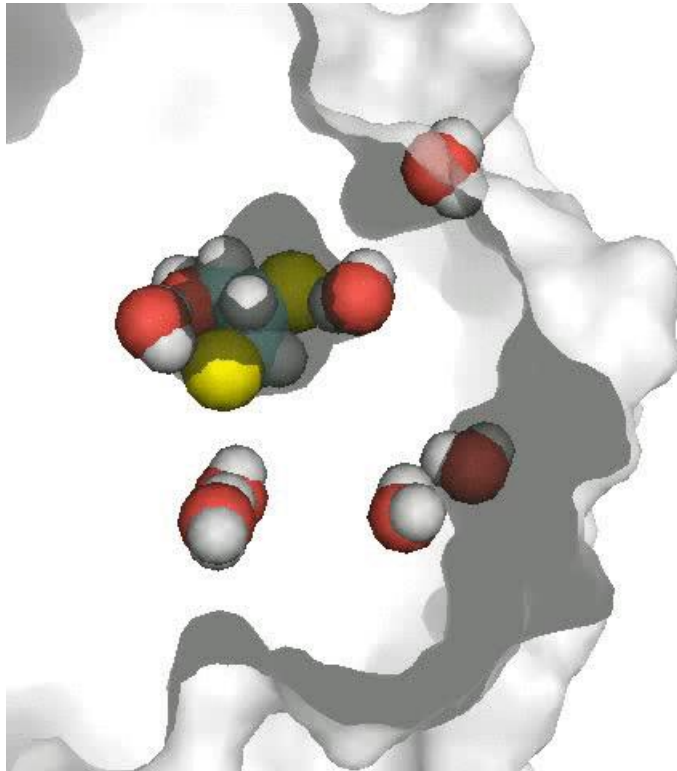
# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

- ❑ **výsledný enzym DhaA31**
  - 5 bodový mutant
  - $k_{\text{cat}} = 1.26 \text{ s}^{-1}$
- ❑ **přístupové tunely uzavřené**

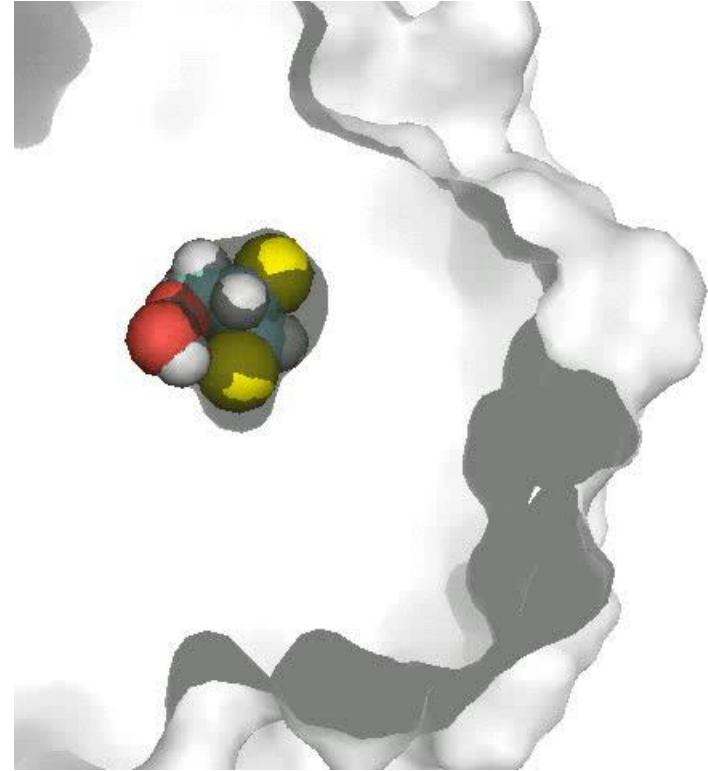
**Co je příčinou zlepšení aktivity?**

# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

**DhaA**

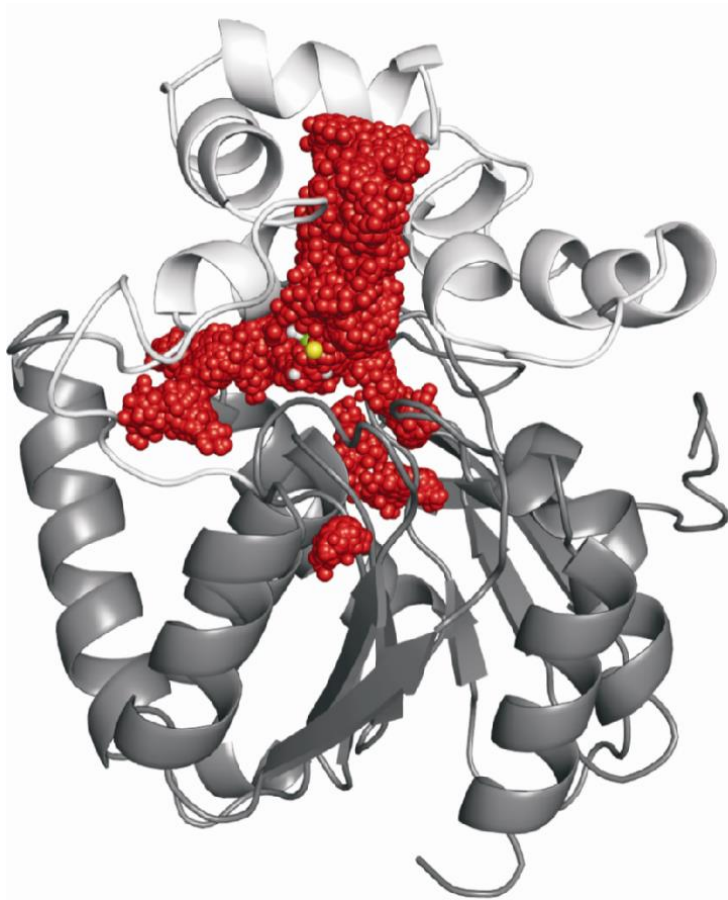


**DhaA 31**

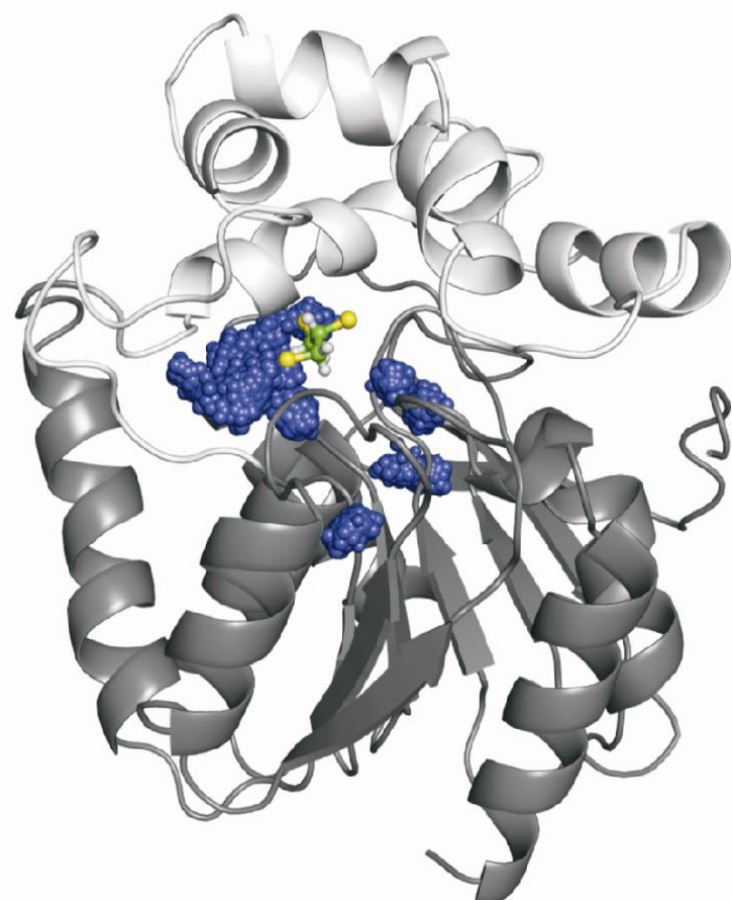


# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

**DhaA**



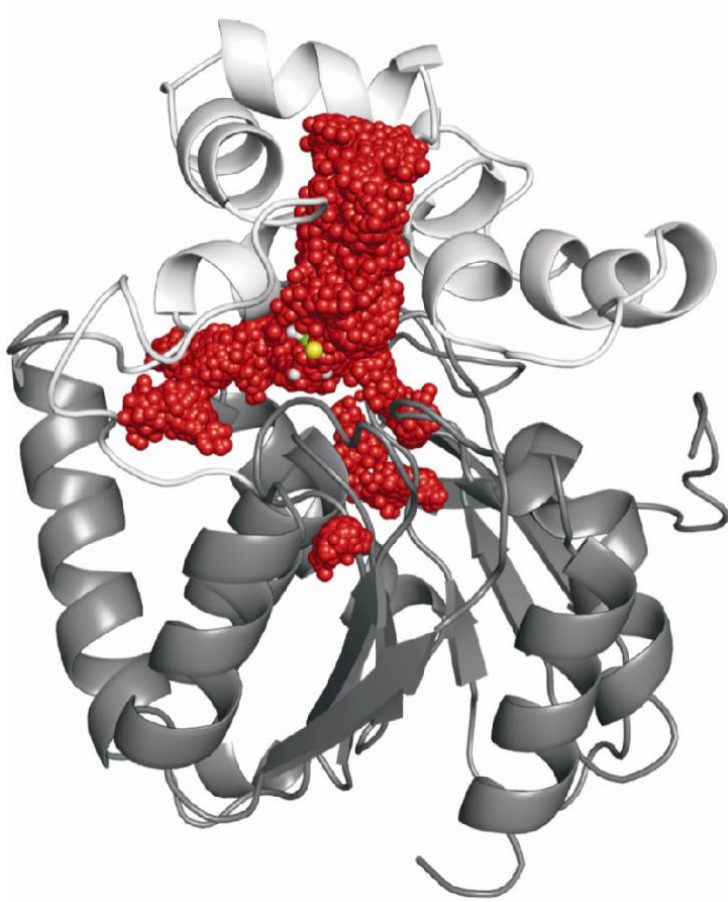
**DhaA 31**



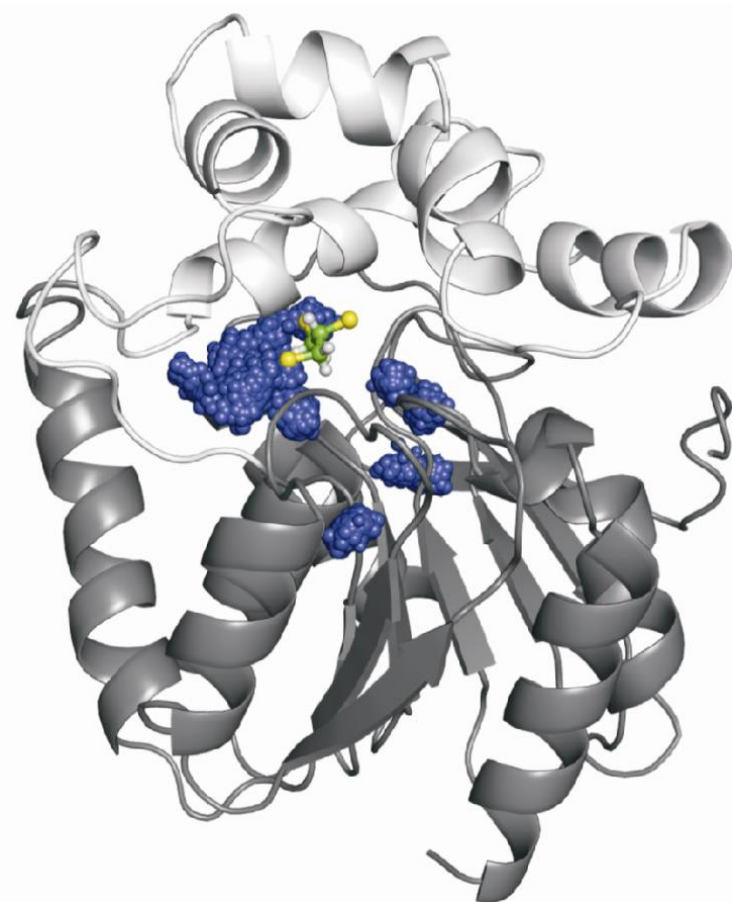


# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

**DhaA**



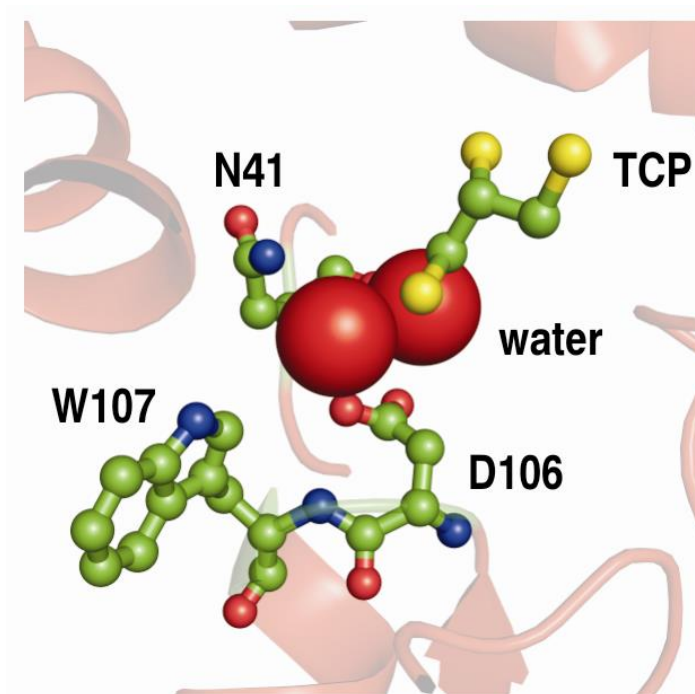
**DhaA 31**



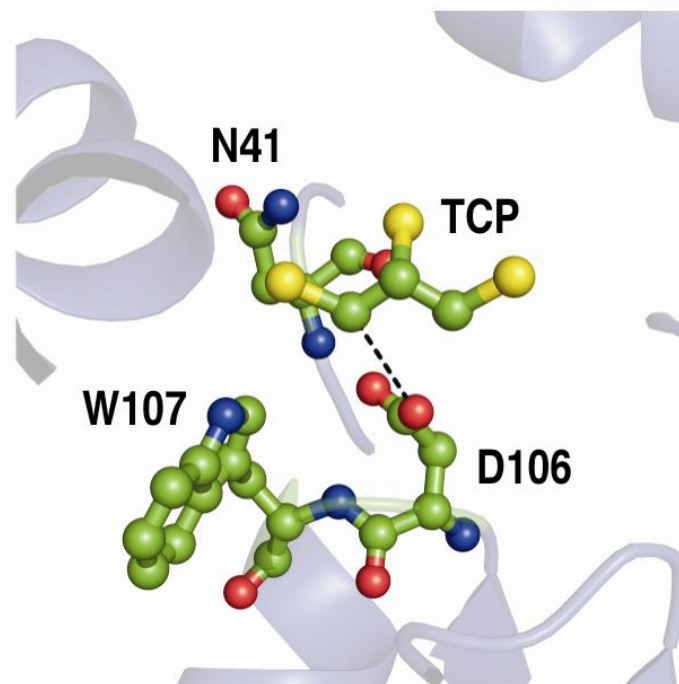
**desolvatace aktivního místa**

# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

DhaA

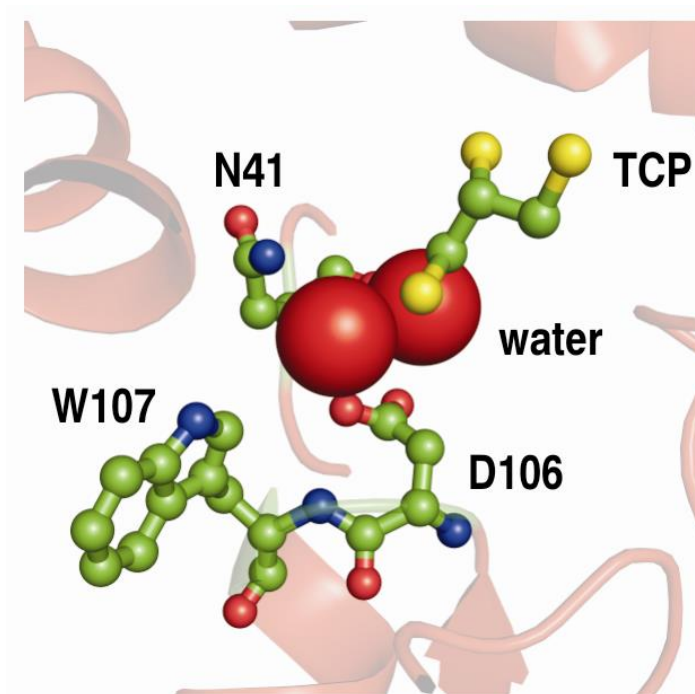


DhaA 31

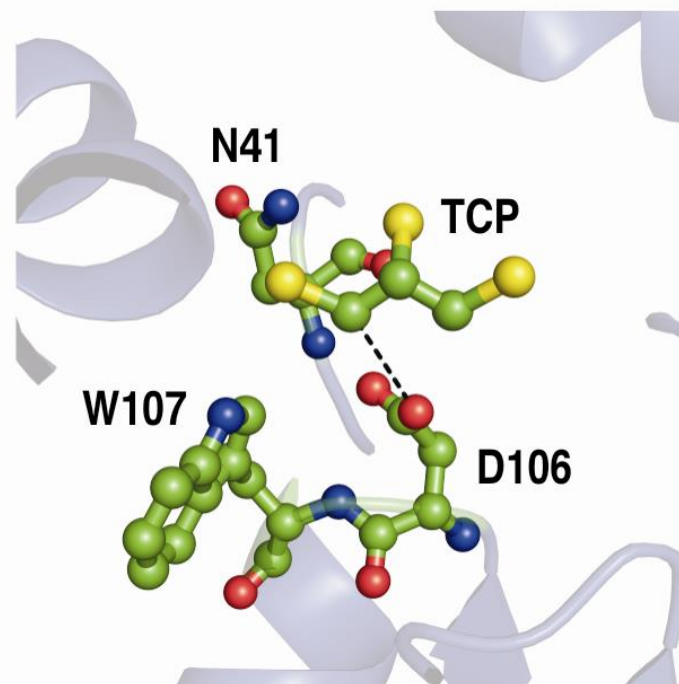


# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

DhaA



DhaA 31



aktivace reaktivního komplexu

# Semi-rationální design aktivnějších enzymů

## □ závěry

- DhaA31 s 16-krát zvýšenou katalytickou rychlostí vůči TCP
- mutace semi-rationálně navrženy ve dvou přístupových tunelech
- zlepšení aktivity způsobeno desolvatací aktivního místa

# Racionální design stabilnějších enzymů

## ☐ **enzymy jako katalyzátory**

- většinou výborná selektivita a aktivita při pokojové teplotě ve vodném roztoku
- pro mnoho aplikací je třeba přítomnost organických rozpouštědel či vyšších teplot
- tyto podmínky často vedou k denaturaci enzymů -> potřeba získávat stabilnější enzymy

## ☐ **halogenalkandehalogenasa DhaA**

- teplota tání  $T_m = 49^\circ\text{C}$
- poločas aktivity při  $60^\circ\text{C}$   $\tau_{1/2} \sim 5 \text{ min}$

# Racionální design stabilnějších enzymů

## ☐ výpočetní metoda FireProt

- vyvinuto na MU
- strukturní a sekvenční analýzy

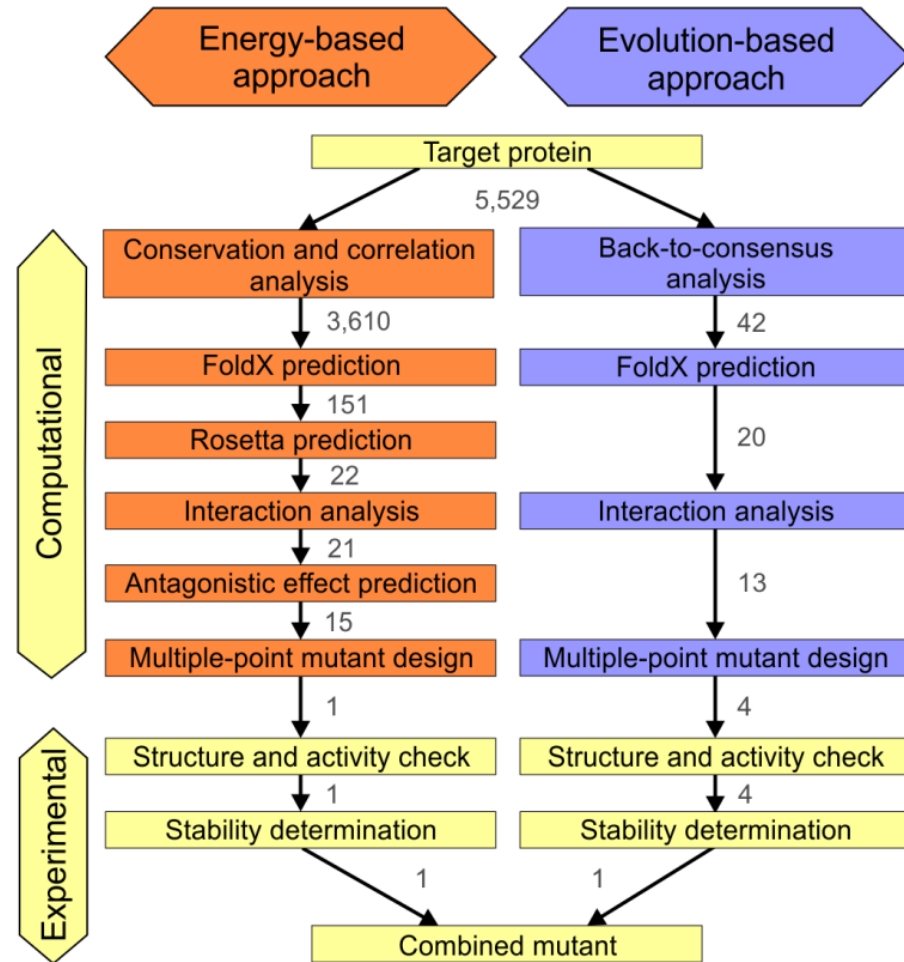
## ☐ stabilizace DhaA

- predikováno 5 500 mutantů
- testováno 5 mutantů

## ☐ výstup

- 3 stabilnější násobní mutanti
- kombinovaný mutant

$$T_m = 74^\circ\text{C} \text{ a } \tau_{1/2} = 72 \text{ h}$$





# Racionální design stabilnějších enzymů

## ☐ metoda GSSM

- „Gene Site Saturation Mutagenesis“
- firmy Diversa a DOW Chemical

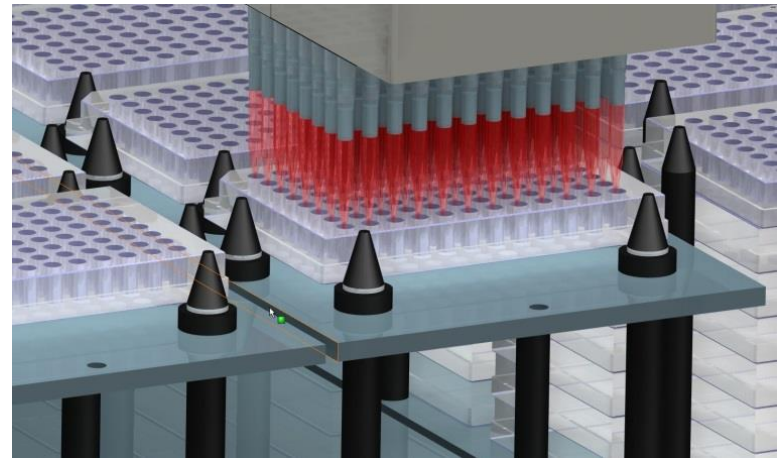
## ☐ stabilizace DhaA

- 315 pozic, všech 19 mutací pro každou pozici (destička s 384 důlky)
- testováno více než **120 000** kolonií

## ☐ výstup

- **10** stabilnějších jednobodových mutantů
- kumulativní mutant

$$T_m = 67^\circ\text{C} \text{ a } \tau_{1/2} = 36 \text{ h}$$



# Racionální design stabilnějších enzymů

## ☐ závěry

	GSSM	Racionální design
<b>vybavení (Kč)</b>	20 000 000	500 000
<b>testování</b>		
výpočetní	-	5 500
laboratorní	120 000	5
náklady (Kč)	1 000 000	80 000
čas	měsíce	týdny
<b>výstupy</b>		
stabilní mutanti	11	4
$\Delta T_m$ (°C)	18	25
$\tau_{1/2}$ (h)	36	72





## □ Molekulové modelování

## □ Inženýrství proteinů

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

## □ **Hledání aktivních látek**

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

# Hledání aktivních látek

## □ **cíl**

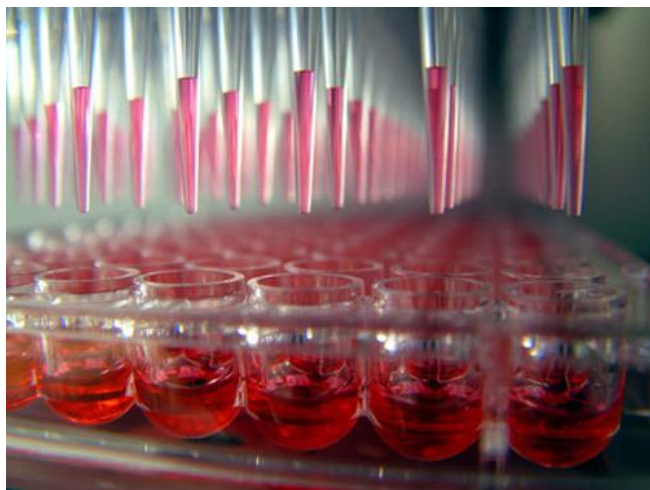
- nalezení specifických netoxických inhibitorů farmakologicky relevantních cílů

## □ **dva alternativní přístupy**

- „high-throughput screening“ – HTS
- „virtual screening“ – VS

# Hledání aktivních látek

## High-throughput screening

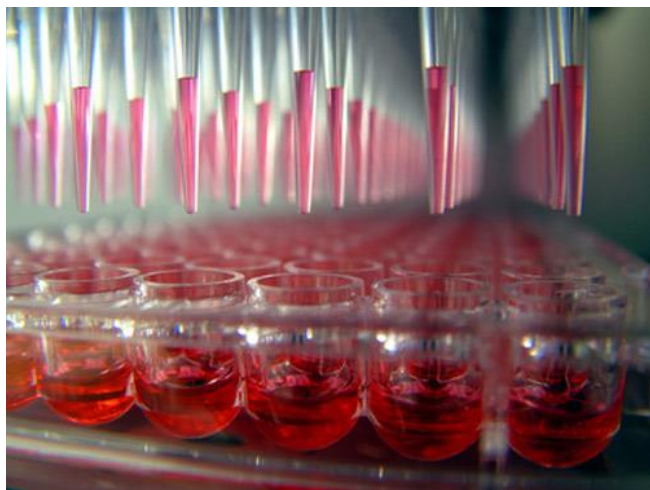


# Hledání aktivních látek

## High-throughput screening

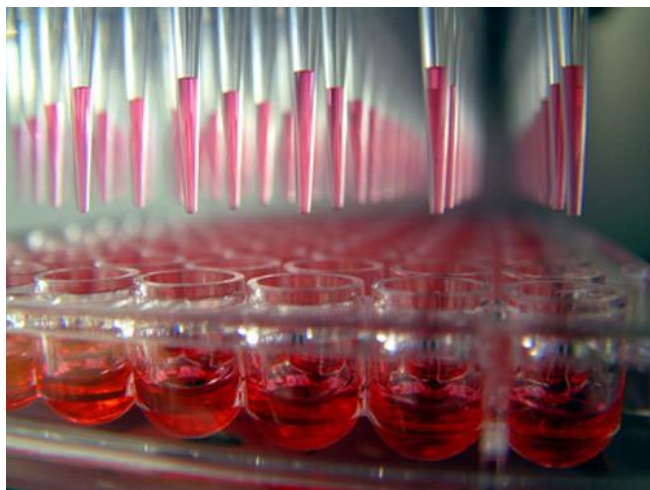


- **falešně pozitivní výsledky** –toxicita, reakce s složkami detekční essey, ...
- **falešně negativní výsledky** – špatná rozpustnost, ...

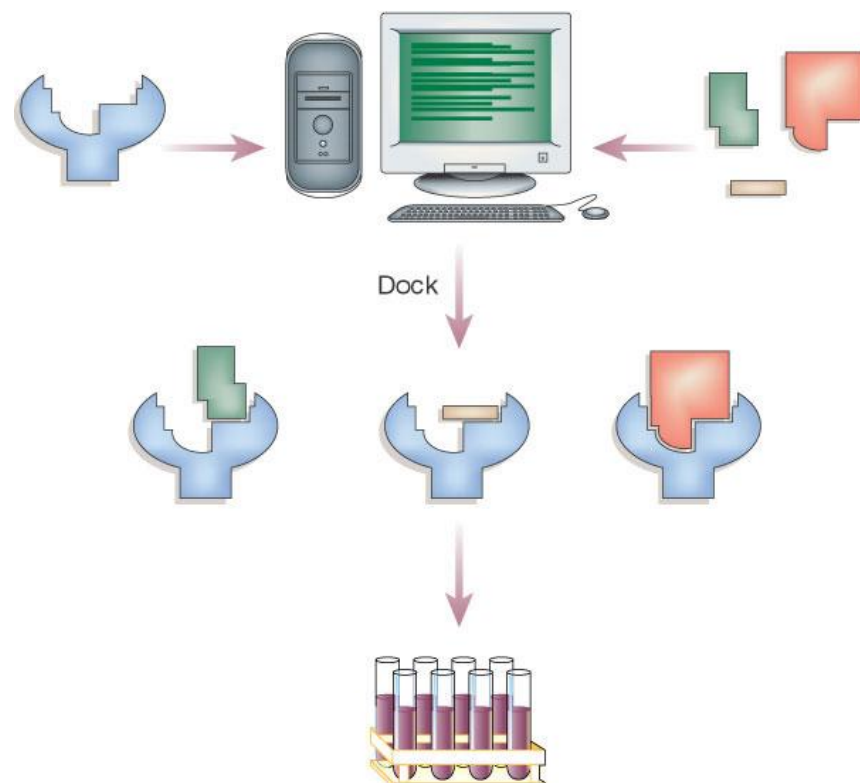


# Hledání aktivních látek

## High-throughput screening



## Virtuální screening





## □ Molekulové modelování

## □ Inženýrství proteinů

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

## □ Hledání aktivních látek

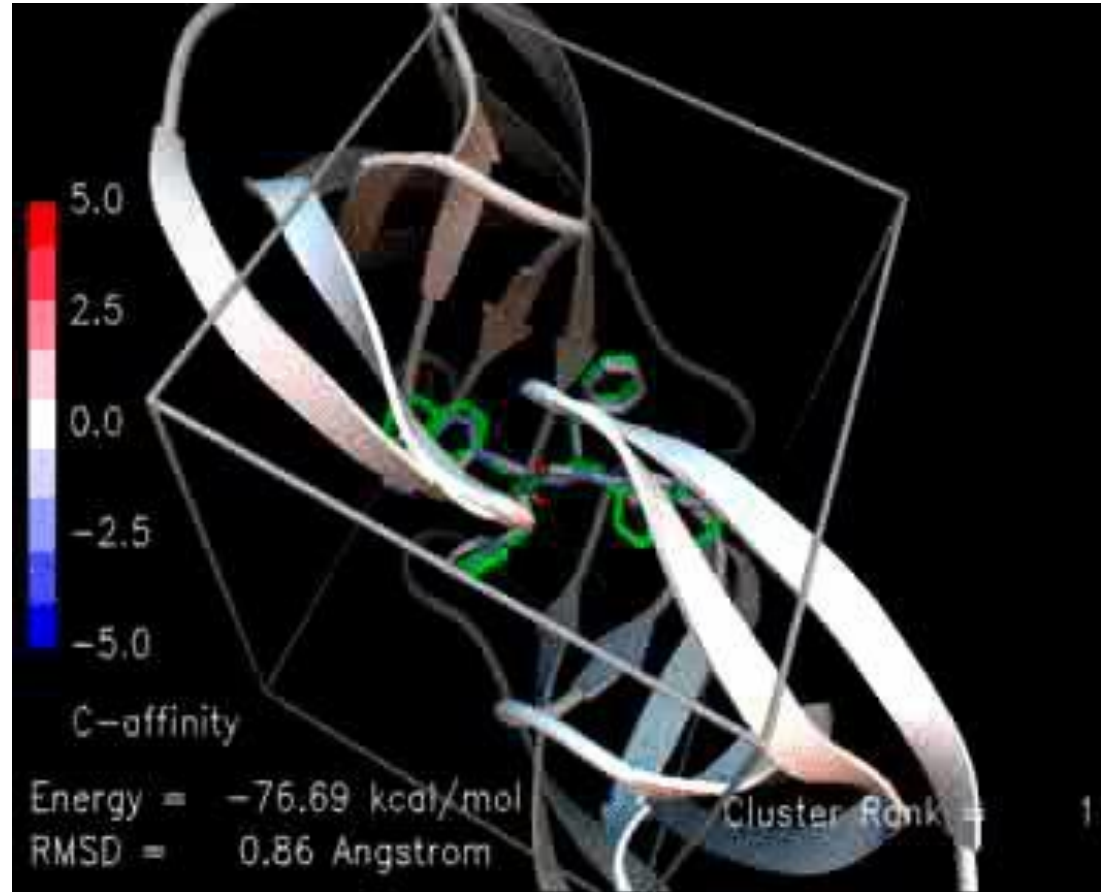
- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady



# Molekulové dokování

## □ dvousložkový proces

- hledání
- hodnocení



## ❑ ideální postup

- vyčerpávající generování všech možných vazebných módů
- sofistikované ohodnocení vazebné energie
- **výpočetně nemožné**

## ❑ nutnost mnoha aproximací:

- zjednodušená reprezentace receptoru
- omezená pohyblivost ligandu
- chytré prohledávací algoritmy
- rychlé hodnotící funkce

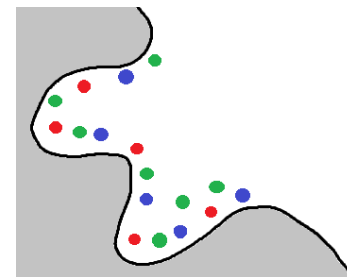




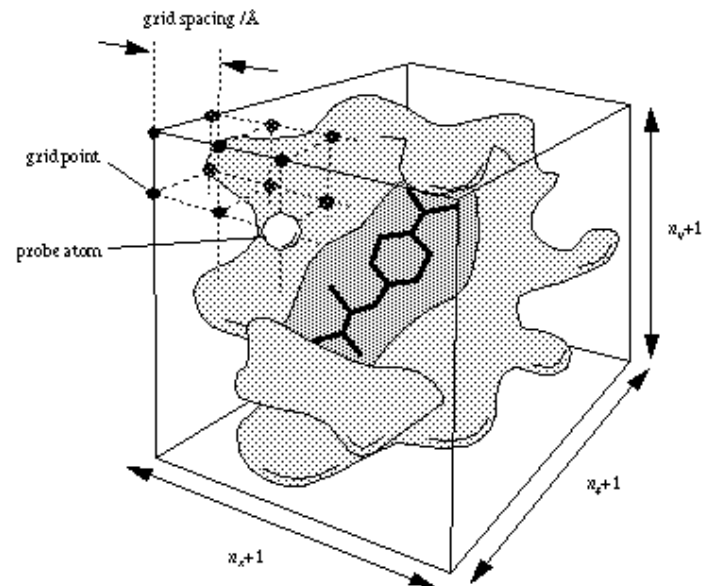
# Reprezentace receptoru

## □ prohledávána pouze relevantní část receptoru

- **reprezentace pomocí dekriptorů** – odvozeny z geometrie či interakčních skupin vazebného místa (donory/acceptory, hydrofóbní residua,...)

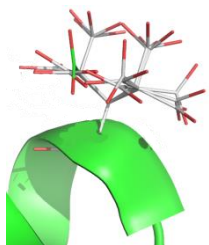


- **mřížková reprezentace** – vazebné místo pokryto pravidelnou mřížkou nesoucí informaci o interakci zkušebního atomu daném bodě s atomy receptoru



## □ pohyblivost receptoru

- **plně rigidní**
- „soft“ doking – použití tolerantní hodnotící funkce, která napodobí plasticitu jinak rigidního receptoru
- **explicitní pohyblivost bočních řetězců** – při hledání je umožněna rotace bočních řetězců předem vybraných residuů s využitím knihoven rotamerů
- **doking do ansámblu struktur** – několik krystalových struktur, NMR ansámblů či trajektorie z MD simulace



## □ běžně použity všechny atomy

- nepolární vodíkové atomy mohou být sjednoceny s jejich příslušnými těžkými atomy (N, C, O), což zjednodušuje výpočty

## □ pohyblivost

- pouze rotace kolem jednoduchých vazeb
- **doking předpřipravené knihovny konformací ligandu** – pouze pro relativně rigidní ligandy vzhledem k exponenciálnímu nárustu konformerů s počtem rotovatelných vazeb
- **přímé zahrnutí konformační změny do prohledávání**
- **fragmentační metody** – ligand je rozsekán na části, které pak jsou rigidně nadokovány do vazebného místa a následně spojeny

## □ geometrické a kombinatorické postupy

- předpokládají že vazba je řízena tvarovou či fyzikálně-chemickou komplementaritou mezi ligandem a vazebným místem receptoru
- a že míra komplementarity je proporciální vazebné energii

## □ energetické a stochastické postupy

- snaží se přímo najít globální minimum volné energie vazby odpovídající experimentální struktuře
- náhodnostní povaha těchto metod vždy vyžaduje provádět několik nezávislých výpočtů k získání konzistentních výsledků

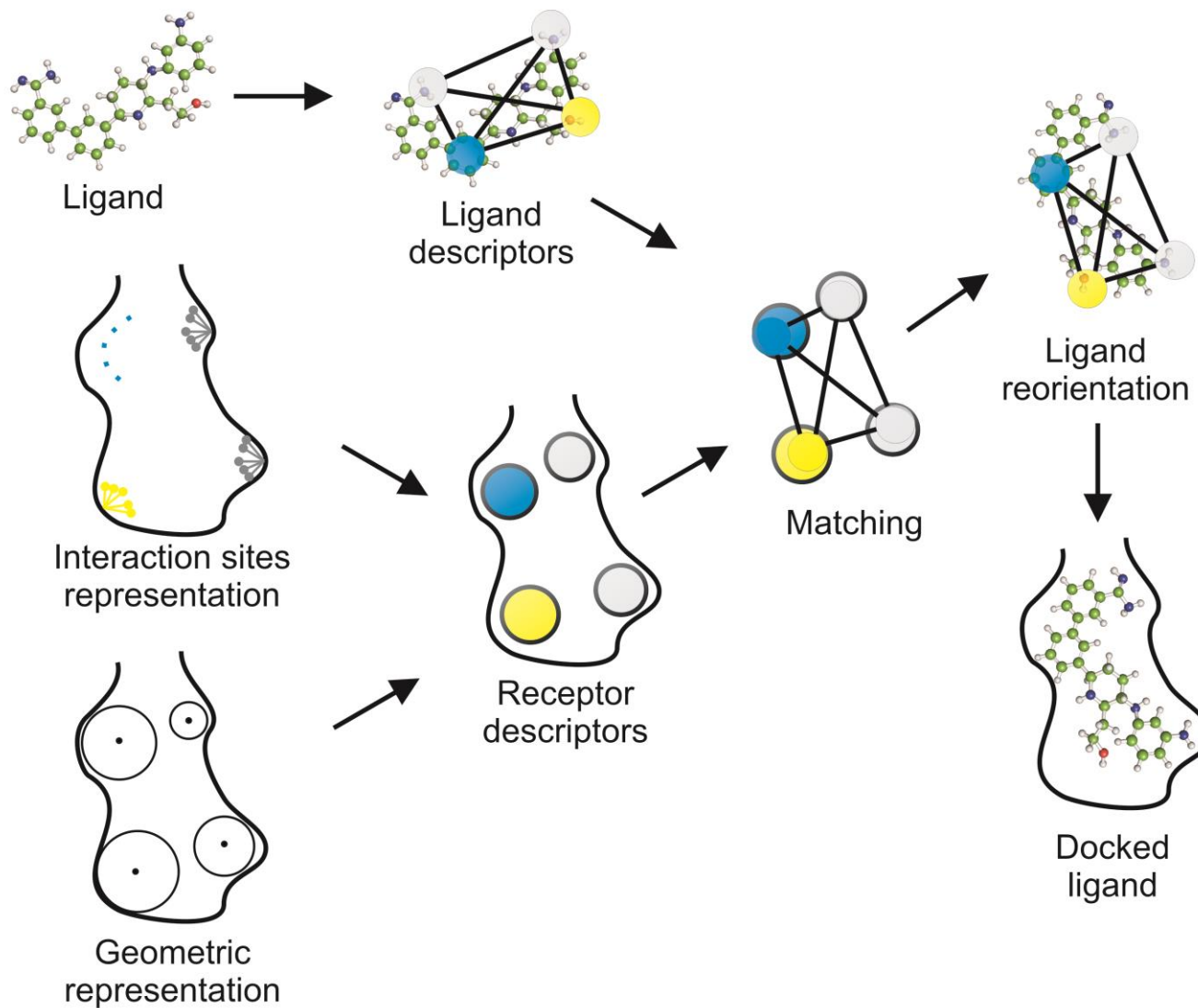
## □ „matching“ algoritmus

- ligand i vazebné místo reprezentováno pomocí **deskriptorů** odvozených z jejich geometrie či přítomnosti specifických interakčních míst (funkčních skupin)
- snaží se **přiložit odpovídající části** ligandu a vazebného místa, čímž predikuje možný vazebný mód ligandu

## □ nástroje

- DOCK, SLIDE ...

# Geometrické postupy



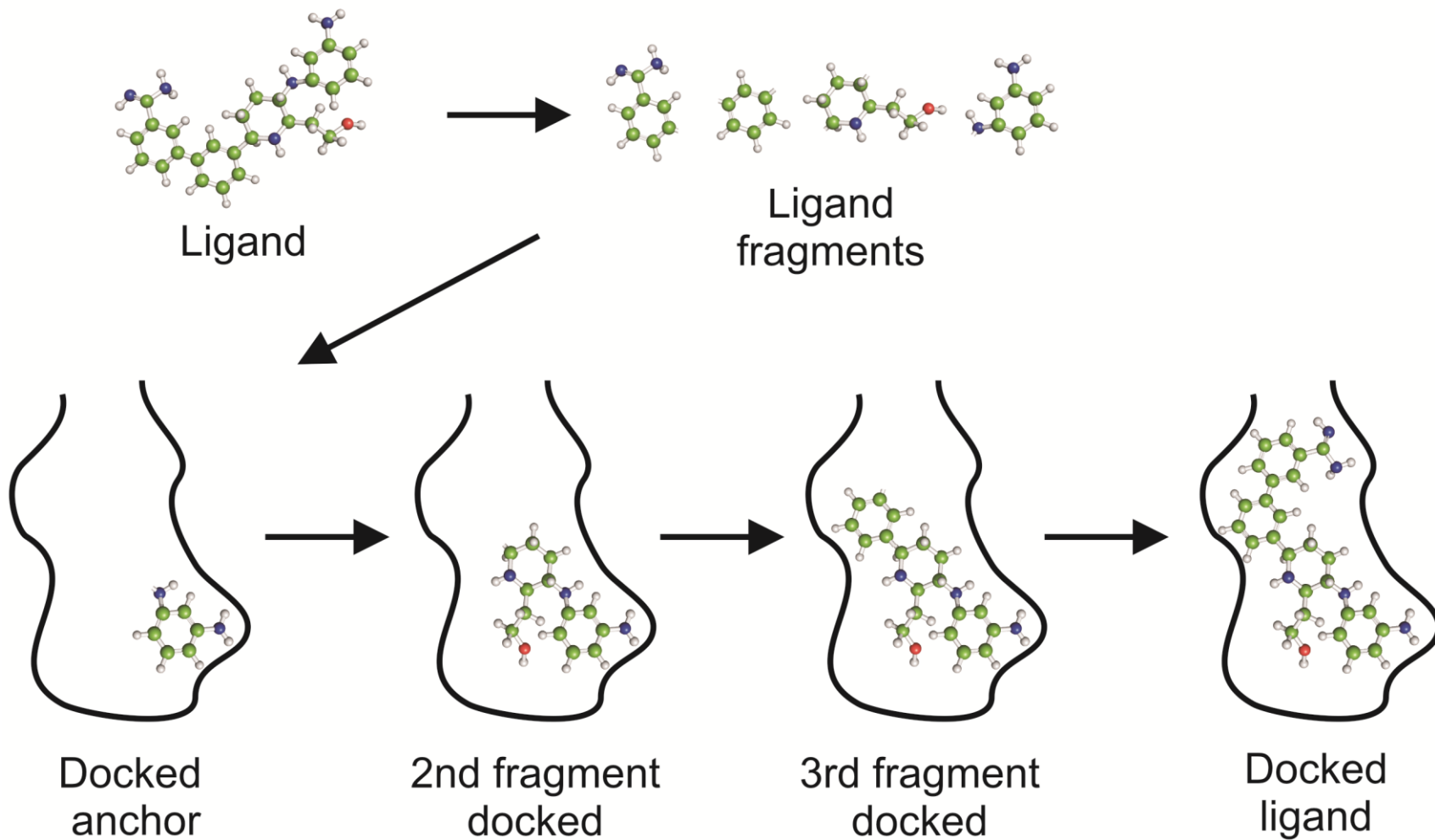
## □ „fragment-based“ algoritmus

- ligand je nejprve rozdělen na jednotlivé rigidní části
- následně je ligand opět sestaven jedním z následujících postupů
  - **inkrementální konstrukce**– části jsou ve vzájemné návaznosti dokovány do receptoru až je vytvořen celý ligand
  - **umísťování a propojování částí**– všechny části ligandu jsou dokovány simultáně a následně propojeny

## □ nástroje

- FlexX, eHITS ...

# Geometrické postupy





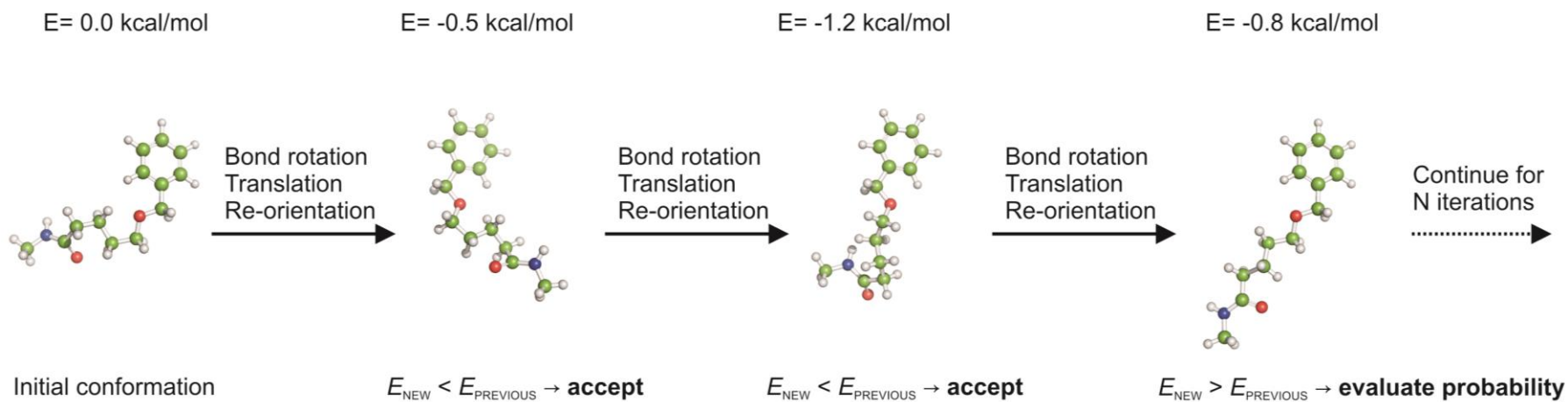
## □ Monte Carlo algoritmus

- prohledává interakční prostor ligandu s receptorem pomocí **iterativního vnášení náhodných změn** v pozici, orientaci či konformaci ligandu a následného ohodnocení nového vazebného módu pomocí **přijímacího kritéria**
- nový vazebný mód je **přijat vždy** pokud je jeho energie nižší než energie původního módu případně je **přijat s pravděpodobností** odrážející rozdíl energií daných módů

## □ nástroje

- ICM, Glide ...

# Stochastické energetické postupy



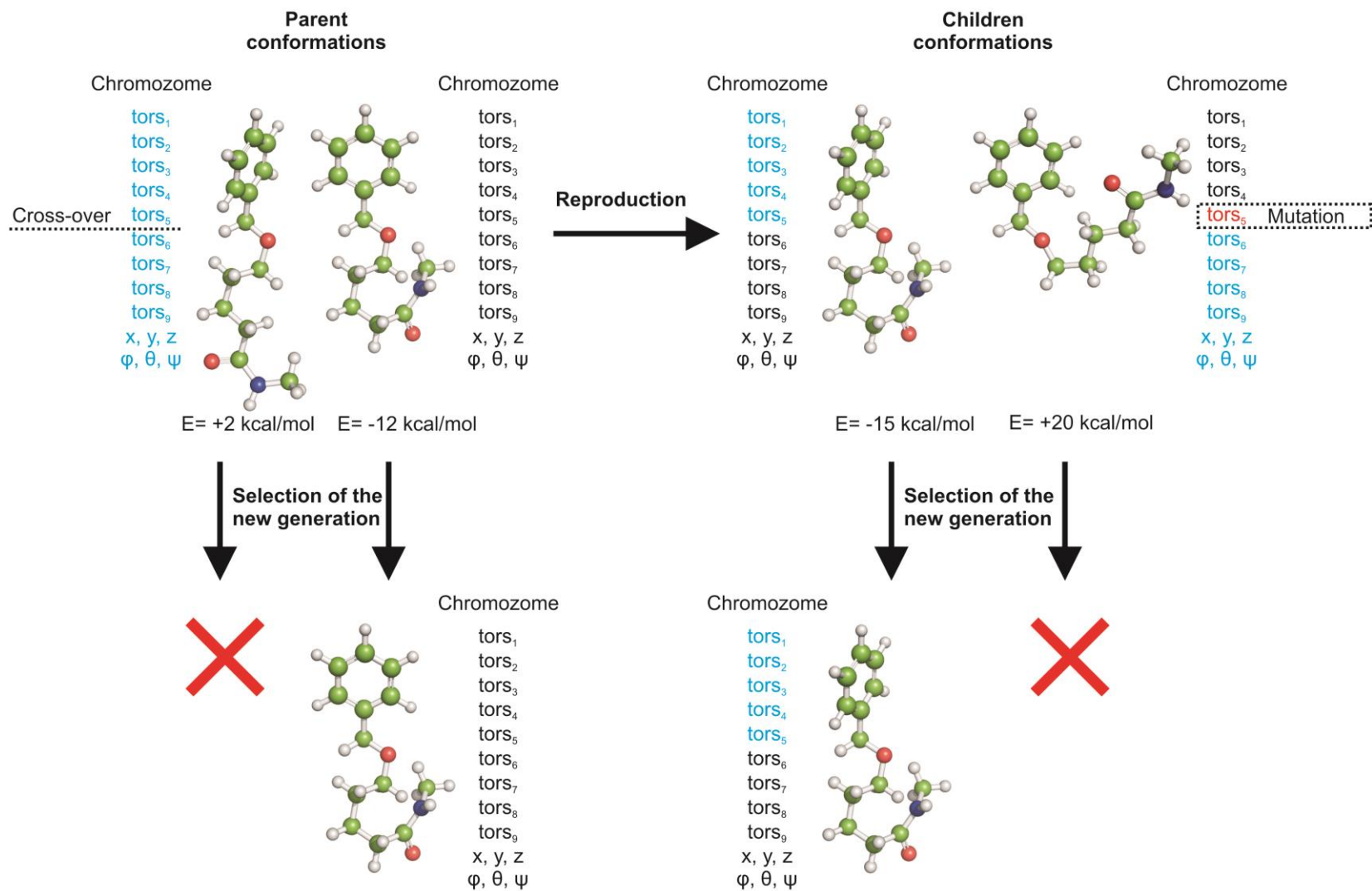
## □ genetický algoritmus

- vazebné módy všech ligandů of all ligands from náhodně vytvořené počáteční populace jsou zakódovány v jejich „genech“, které jsou vystaveny náhodným genetickým modifikacím (crossover, mutace)
- jednotlivci (vazebné módy) s lepší životaschopností (odpovídá jejich vazebné energii) mají vyšší šanci přežít a reprodukovat se do další generace, což vede k postupnému nárůstu životaschopnosti každé následující generace a nalezení optimálního vazebného módu

## □ nástroje

- AutoDock , GOLD ...

# Stochastické energetické postupy



## □ hodnotící funkce

- evaluation various binding modes provided by searching algorithms
- computationally **efficient** and provide **accurate** description of protein-ligand interactions

## □ využití hodnotících funkcí k řazení

- **několika vazebných módů jednoho ligandu v rámci jednoho receptoru** – důležité pro výběr módu blízkého experimentálnímu
- **několika různých ligandů navázaných do jednoho receptoru** – stanovení specifity substátů či inhibitorů
- **jednoho ligandu navázaného do více různých receptorů** – anotace možné funkce proteinů a studium selektivity léčiv (vedlejší účinky)

## □ kategorie hodnotících funkcí

### ▪ založené na silovém poli

- využívají nevazebné členy zavedených silových polí
- relativně přesné energie
- **vysoké výpočetní nároky** -> pouze výpočty afinity již vybraných vazebných módů - **nevyužívají se během prohledávání**

## □ kategorie hodnotících funkcí

### ▪ empirické

- odvozeny fitem následující rovnice to na sadě experimentálních vazebných afinit známých komplexů protein-ligand

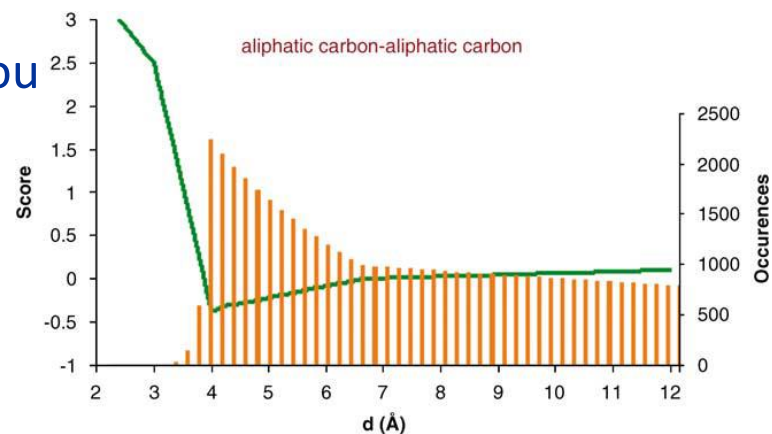
$$\Delta G_{bind} = \alpha \cdot \Delta G_{hb} + \beta \cdot \Delta G_{lipo} + \gamma \cdot \Delta G_{el} + \delta \cdot \Delta G_{rot} + \dots$$

- rychlé vyhodnocení
- arbitrární výběr relevantních členů rovnice -> selže v případě, kdy je vazba řízena typem interakce nezahrnuté v rovnici
- váhy jednotlivých interakcí závisí na volbě sady komplexů k fitování

## □ kategorie hodnotících funkcí

### ▪ znalostní

- pomocí **statistické analýzy** využívá **znalost** vazby ligandů v proteinech, která je implicitně uložena ve **strukturních datech**
- párové atomové potencionály jsou odvozeny ze vzdáleností těchto párů ve strukturních databázích
- **rychlé vyhodnocení**
- popisuje **všechny typy interackí** bez potřeby jejich výběru
- **problém** nastáva pouze pokud **strukturní data nemají dostatek informace** o daném páru atomů (e.g. halogenidy, kovy, ...)

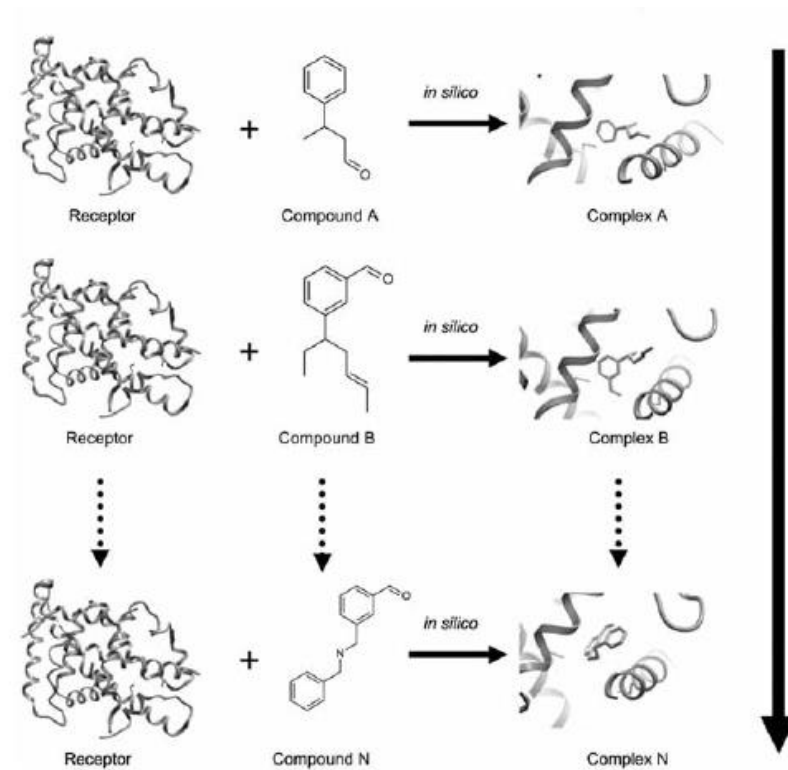




# Virtuální screening

## □ masivní molekulové dokování

- typicky 100 tis. až 10 mil. ligandů
- předpřipravené knihovny ligandů
- filtrována toxicita, rozpustnost, podobnost ligandů, ...





## □ Molekulové modelování

## □ Inženýrství proteinů

- Typické přístupy
- Metody modelování
- Příklady

## □ **Hledání aktivních látek**

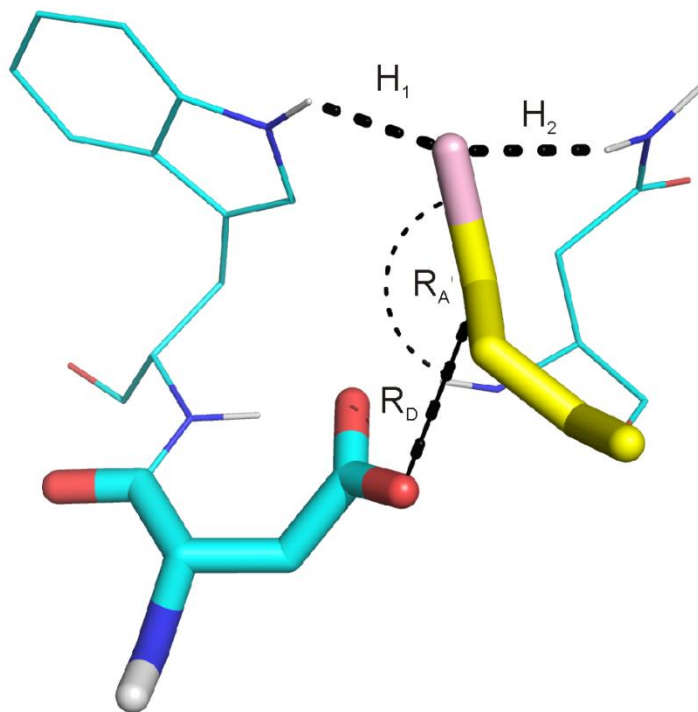
- Typické přístupy
- Metody modelování
- **Příklady**



# Nové substráty dehalogenas

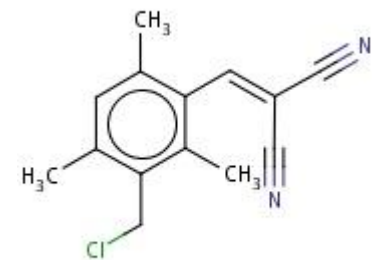
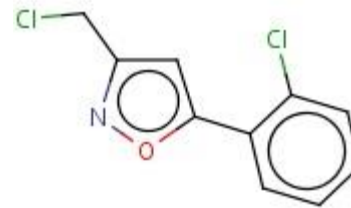
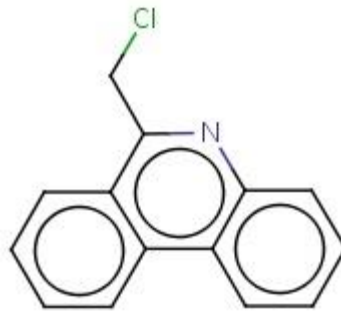
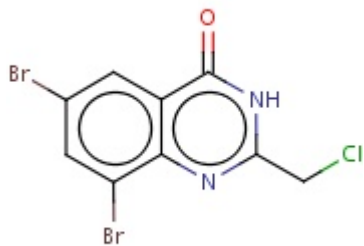
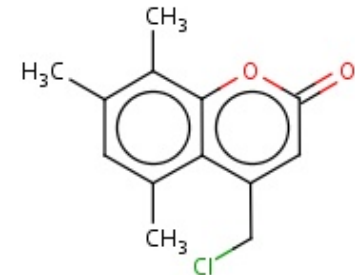
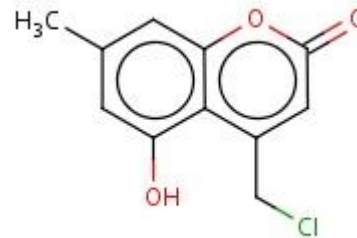
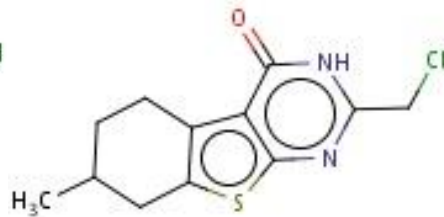
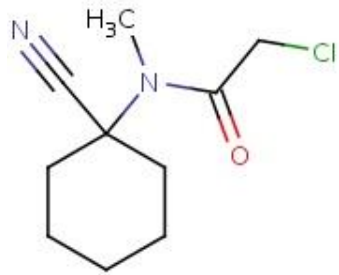
## □ použitý protokol

- databáze 56 000 halogenovaných látek
- dokováno s pomocí AutoDock 4.0
- hodnocení geometrie nalezeného komplexu z hlediska reaktivity



# Nové substráty dehalogenas

- **identifikováno 8 nových typů substrátu enzymu Dmma**
  - mezi nimi i **fluorescenční substrát** a **analoga herbicidů**



# Nové substráty dehalogenas

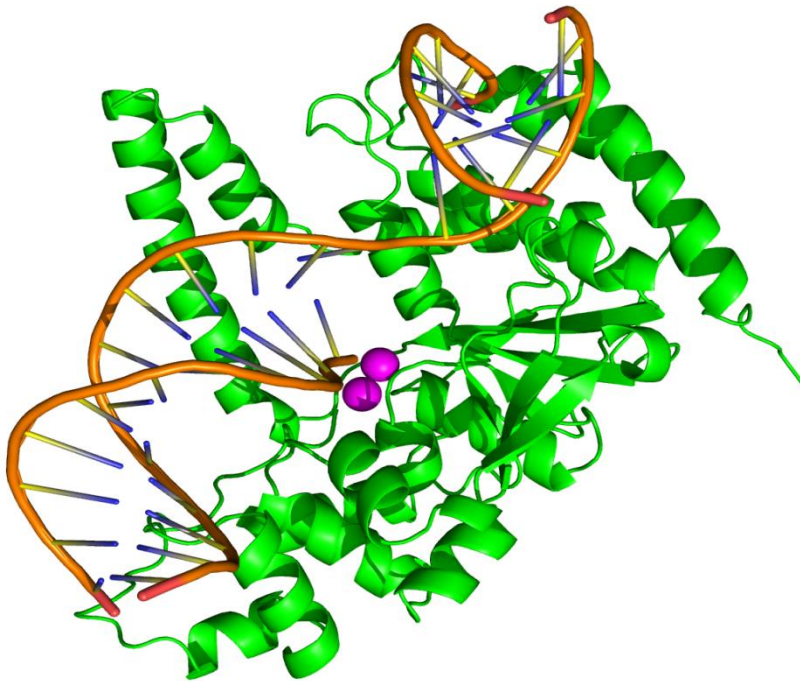
## □ závěry

- nalezeny nové substráty u všech studovaných dehalogenas
- úspěšnost virtuálního screeningu se pohybovala kolem 50%
- pro DmmA bylo nalezeno 8 zcela nových typů substrátů

# Inhibitory endonukleasy MUS81

## □ **proteinový cíl**

- strukturně specifická endonukleasa MUS81
- účastní reparace DNA
- zajišťuje stabilitu genomu -> představuje potenciální cíl pro vazbu protirakovinných léčiv





# Inhibitory endonukleazy MUS81

## □ HTS

- platforma Centra pro chemickou genetiku AVČR, Praha
- experimentálně testováno cca 23 000 látek

## □ výstup

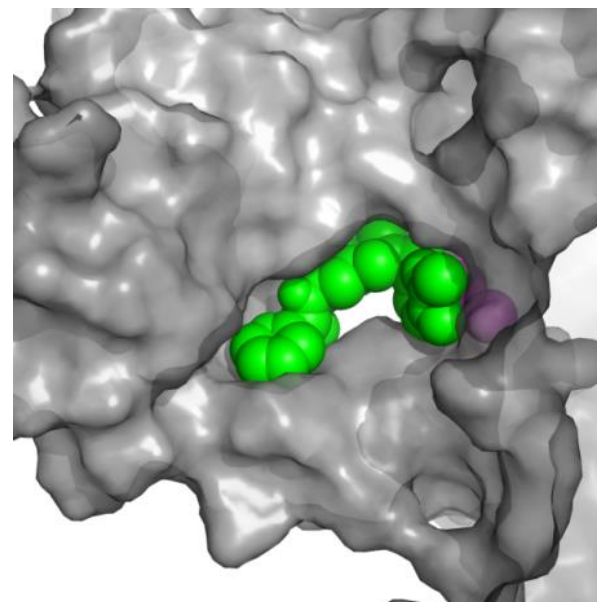
- identifikovaný inhibitor:  $IC_{50} = 50 \mu M$





# Inhibitory endonukleasy MUS81

- ❑ **softwarová platforma vyvinuta na MU využívající**
  - molekulové dokování - Autodock Vina
  - rescoring – výpočty vazebné energie AMBER12 a neuronovou sítí NNScore2.0
- ❑ **aplikace**
  - výpočetně testováno přes 140 000 rozdílných látek
  - experimentálně testováno 19 látek
- ❑ **výstup**
  - 6 strukturně odlišných inhibitorů s  $IC_{50} \leq 50 \mu M$
  - nejlepší inhibitor  $IC_{50} = 5 \mu M$



# Inhibitory endonukleasy MUS81

## ☐ závěr

	HTS	VS
<b>vybavení (Kč)</b>	50 000 000	500 000
<b>testování</b>		
výpočetní	-	140 000
laboratorní	23 000	19
náklady (Kč)	2 000 000	40 000
čas	týdny	dny
<b>výstupy</b>		
počet inhibitorů	1	6
IC <sub>50</sub> (μM)	50	5

## **Molekulové modelování:**

- 1) aplikovatelné na celou řadu zajímavých problémů
- 2) poskytuje pohled na detaily nedostupné většině experimentů
- 3) díky své rychlosti umožňuje otestovat mnoho hypotéz
- 4) poskytuje prakticky orientované postupy
- 5) přináší významné časové i finanční úspory