

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

Osnova

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

Osnova

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

Molekulové modelování



- “Teoretická či výpočetní technika, která nám poskytne vhled do chování molekulárního systému.”

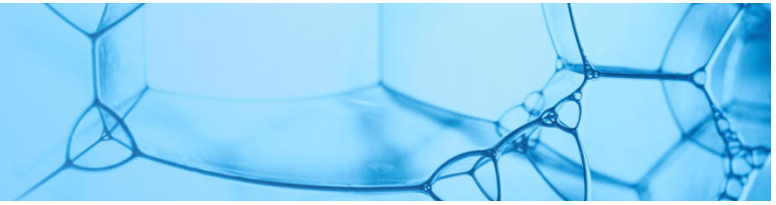
- **využití**
 - analýza struktury proteinů a předpověď jejich funkce
 - předpověď dynamiky a stability proteinů
 - předpověď interakcí mezi ligandem a proteinem či více proteiny
 - předpověď reakčních bariér a mechanismů enzymů
 - předpověď struktury nových proteinů a enzymů

Molekulové modelování



- **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
 - Příklad
- ❑ **Hledání aktivních látek**
 - Typické přístupy
 - Metody modelování
 - Příklad
- ❑ **Shrnutí**

Proteinové inženýrství



- **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



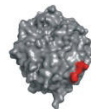
Samostatný mutovaný gen

3. Transformace

4. Expresse proteinu

5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*

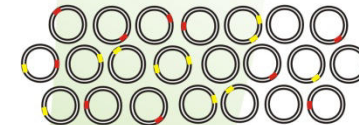


Zkonstruovaný mutantní enzym

ŘÍZENÁ EVOLUCE

1. *není aplikováno*

2. Náhodná mutagenese



Knihovna mutovaných genů
(>10,000 klonů)

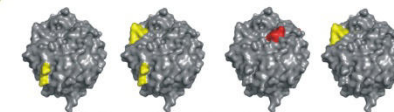
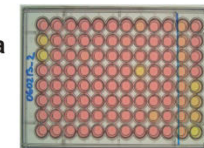
3. Transformace

4. Expresse proteinu

5. *není aplikována*

6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



Vybrané mutantní enzymy

VYLEPŠENÝ
ENZYM

7. Biochemické testování

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

Osnova

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

Modelování pro semi-rationální design

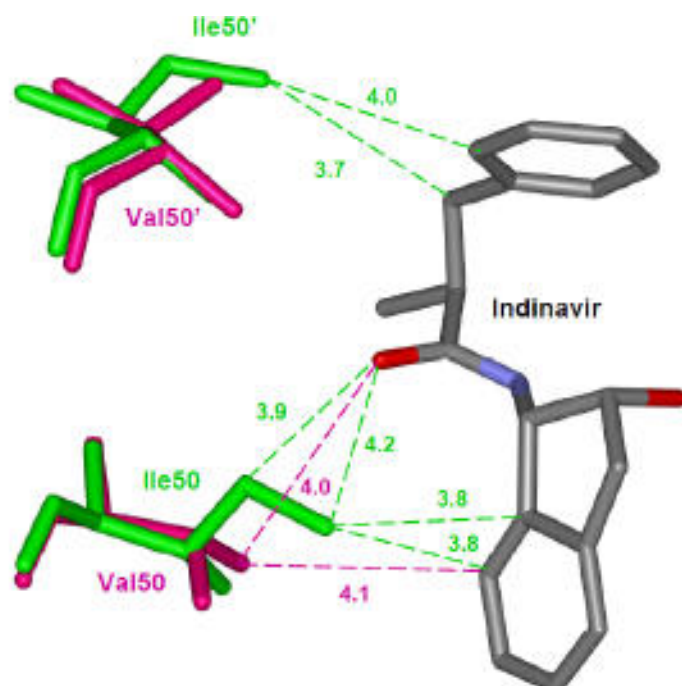
- identifikace relevantních residuů jako hot-spotů pro vylepšení
 - stability
 - katalytických vlastností

Hot-spoty pro vylepšení katalytických vlastností

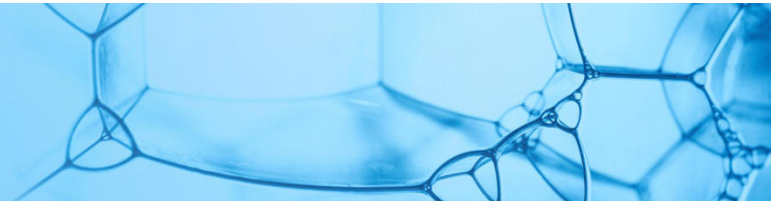
- residua účastnící se vazby substrátů, stabilizace tranzitního stavu či transportu substrátů-produktů → mutace pak mohou vylepšit či narušit vazbu, katalýzu či transport
 - residua tvořící **interakce s ligandem**
 - residua tvořící **vazebnou kapsu**
 - residua tvořící **transportní tunely**

Analýza protein-ligand interakcí

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



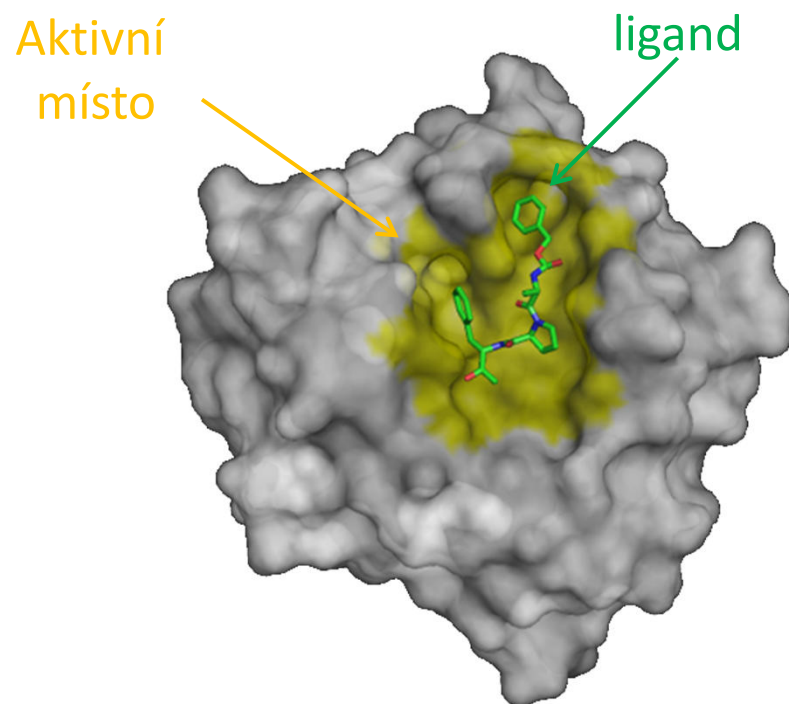
Analýza funkčních kapes



- 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

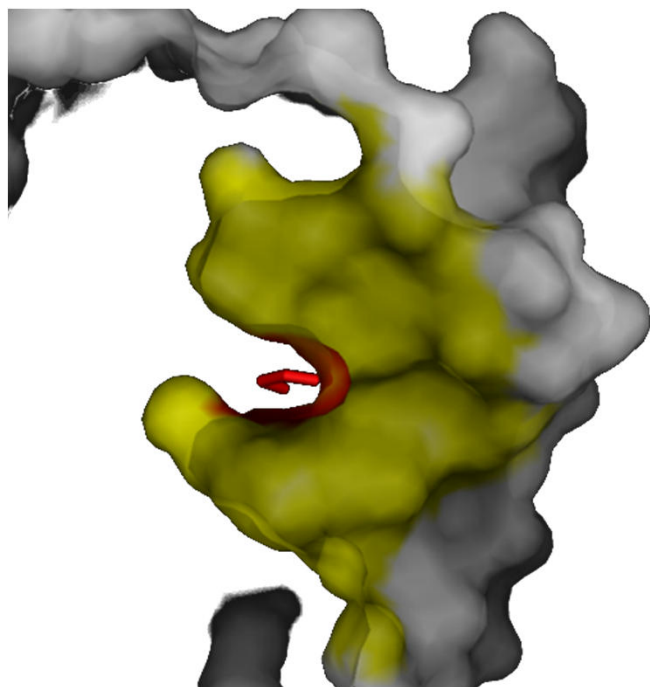
Analýza funkčních kapes

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



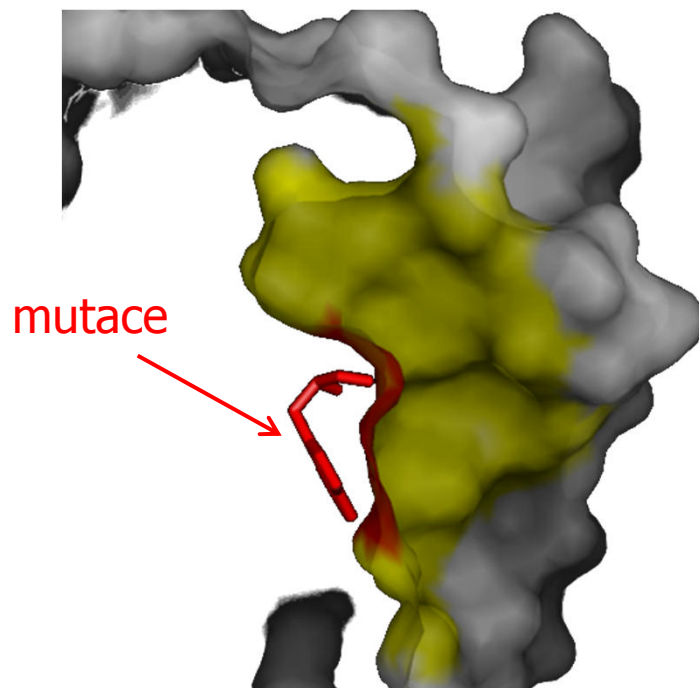
Analýza funkčních kapes

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



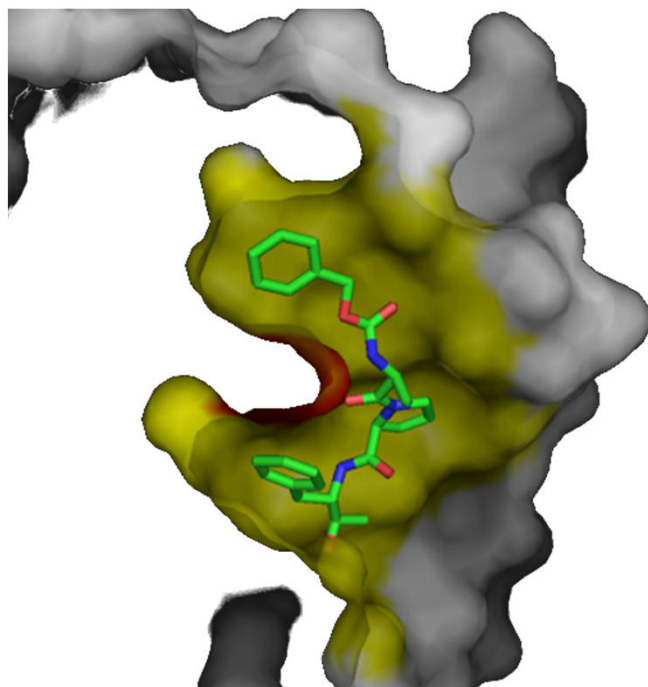
Analýza funkčních kapes

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



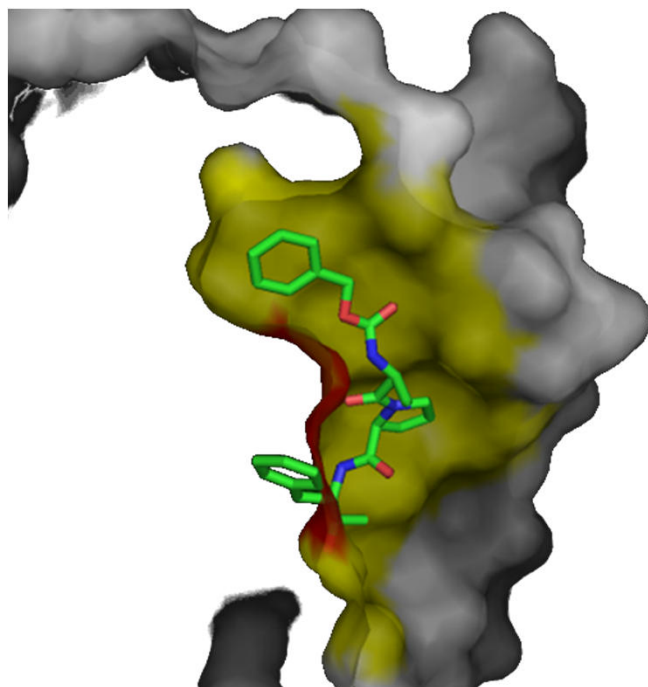
Analýza funkčních kapes

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

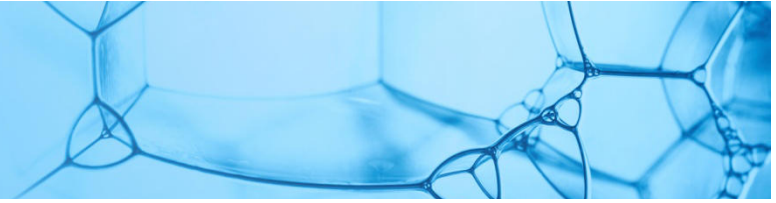


Analýza funkčních kapes

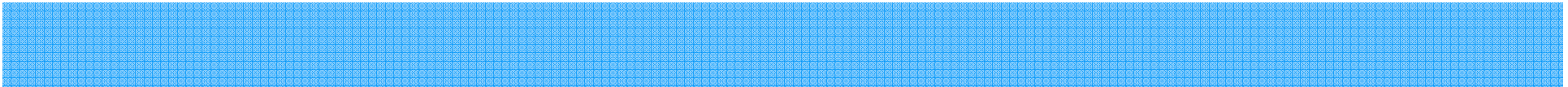
- vazebná a aktivní místa proteinů se často nachází v kapsách, kavitách či žlábcích struktury.



Analýza transportních tunelů

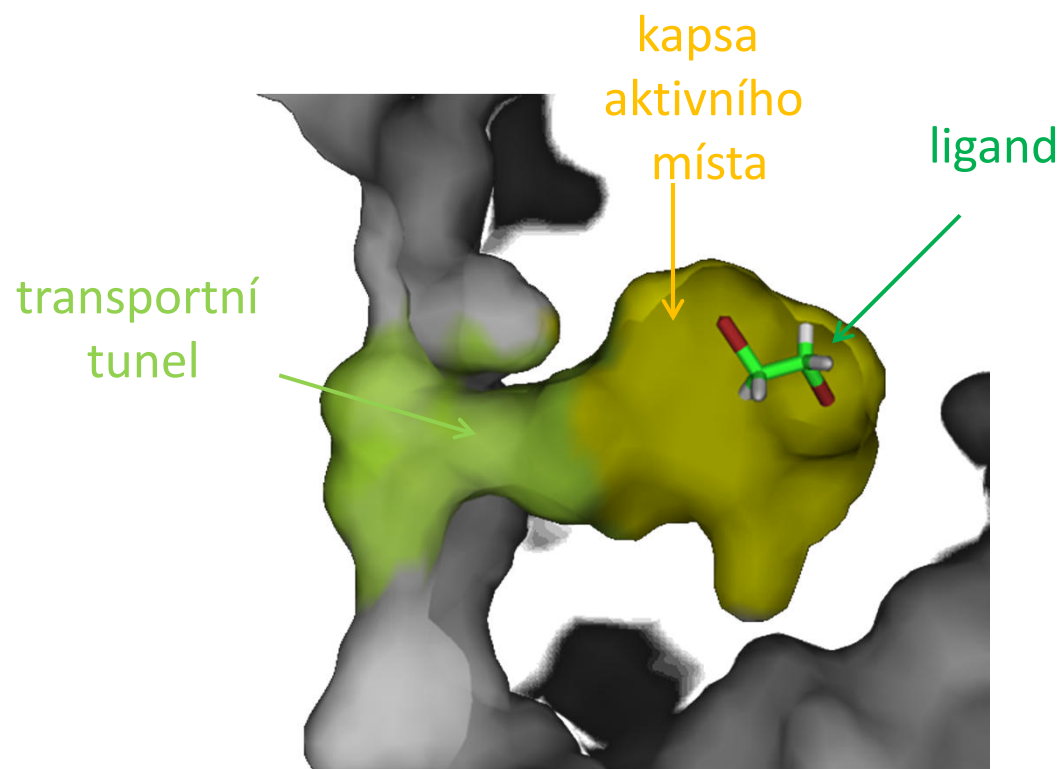


- zanořená vazebná a aktivní místa jsou spojena se povrchem pomocí **transportních tunelů**
 - umožňují selektivní transport molekul
 - jejich mutace může urychlit či omezit transport nativních ligandů či umožnit transport nových ligandů



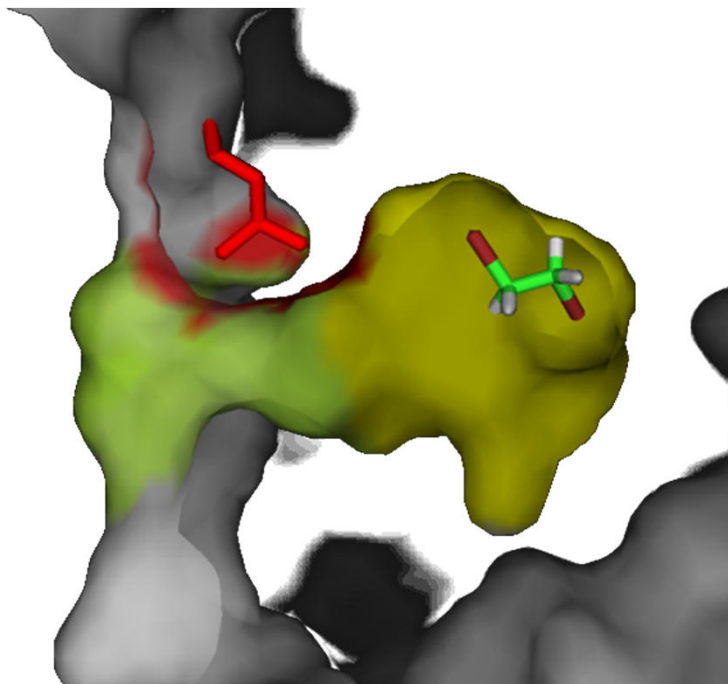
Analýza transportních tunelů

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



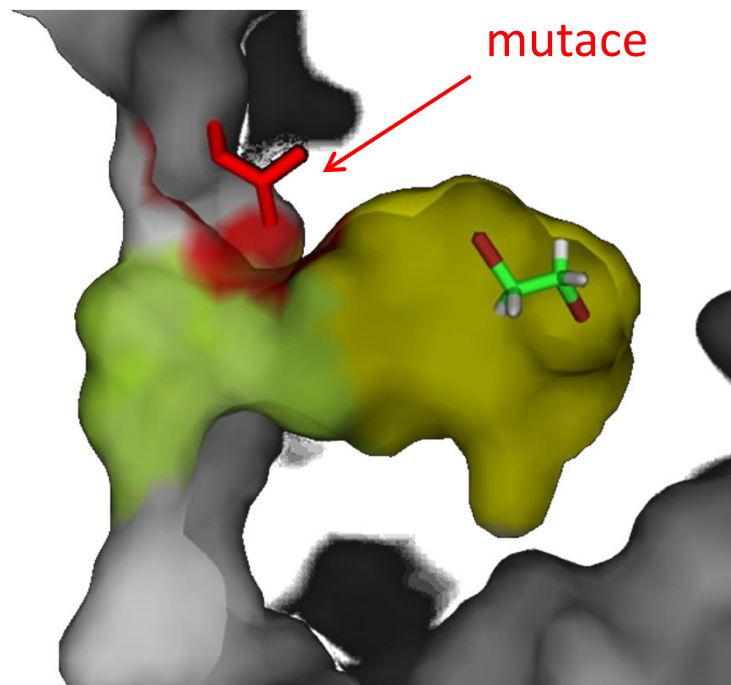
Analýza transportních tunelů

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



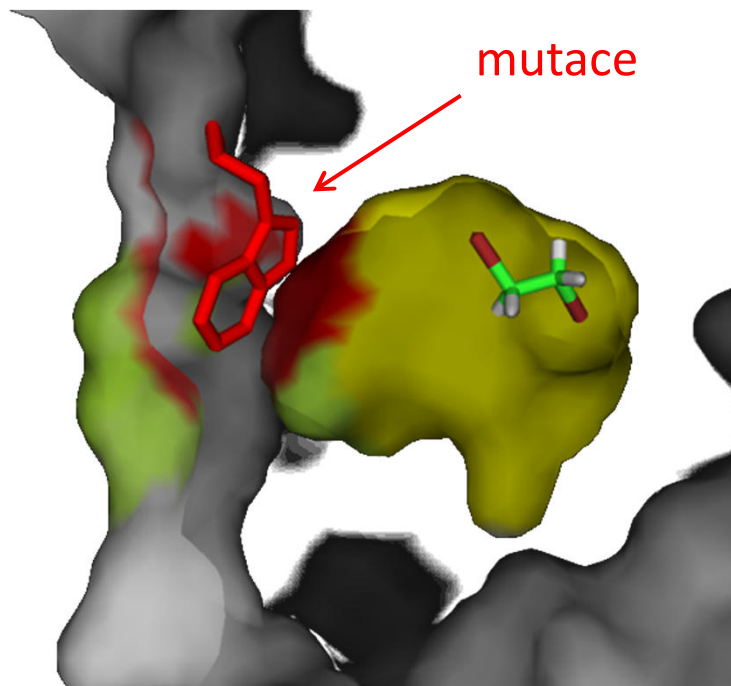
Analýza transportních tunelů

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



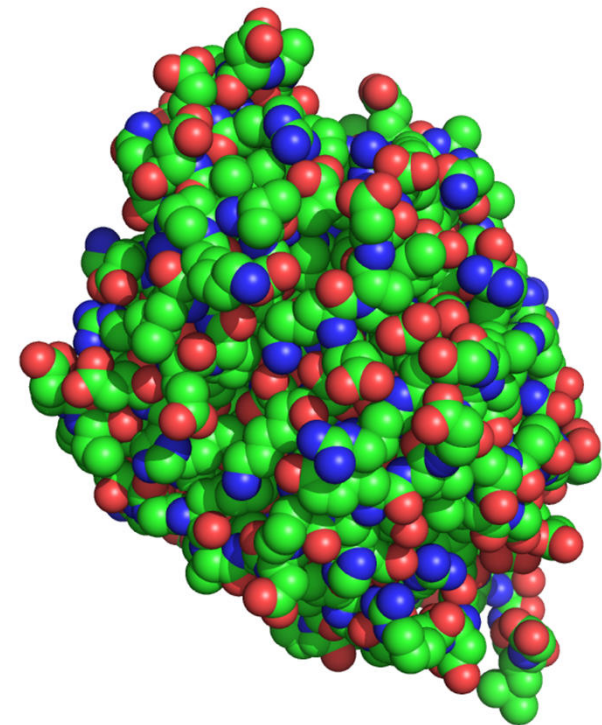
Analýza transportních tunelů

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



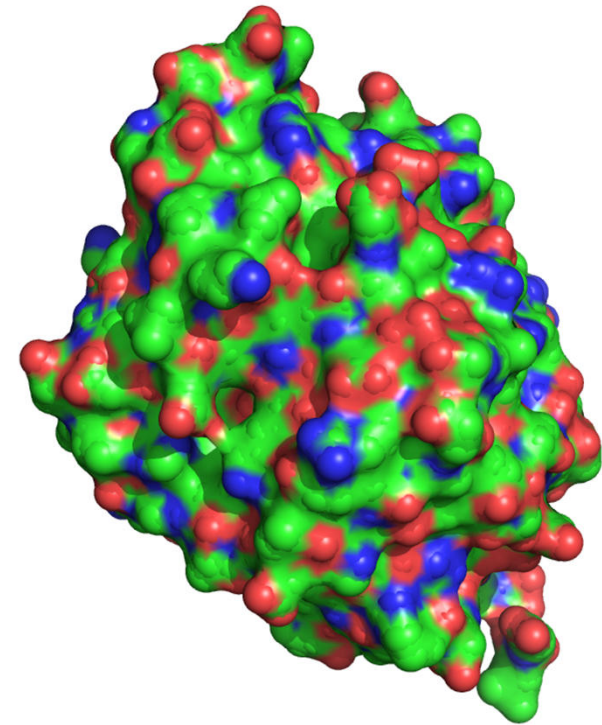
Výpočetní geometrie

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



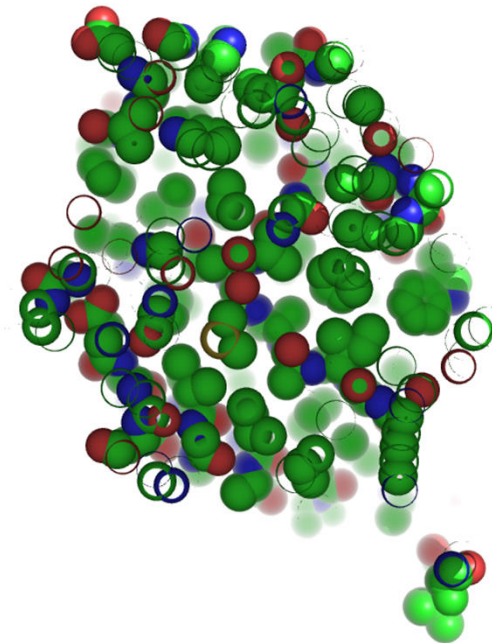
Výpočetní geometrie

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



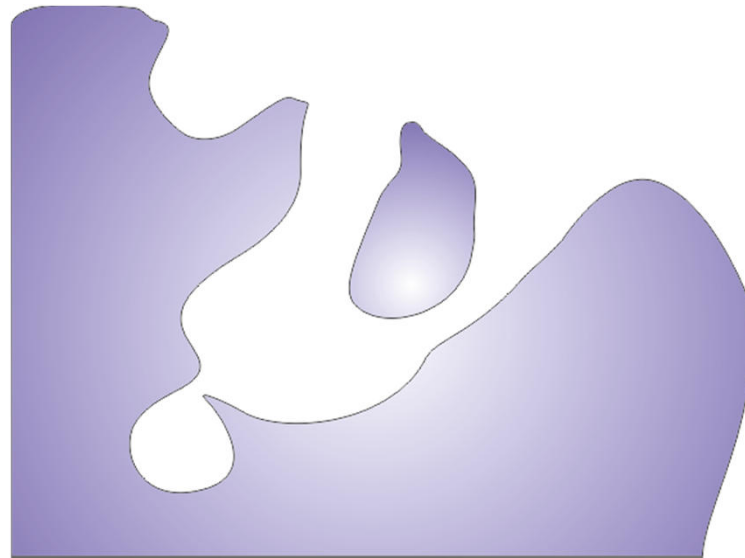
Výpočetní geometrie

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



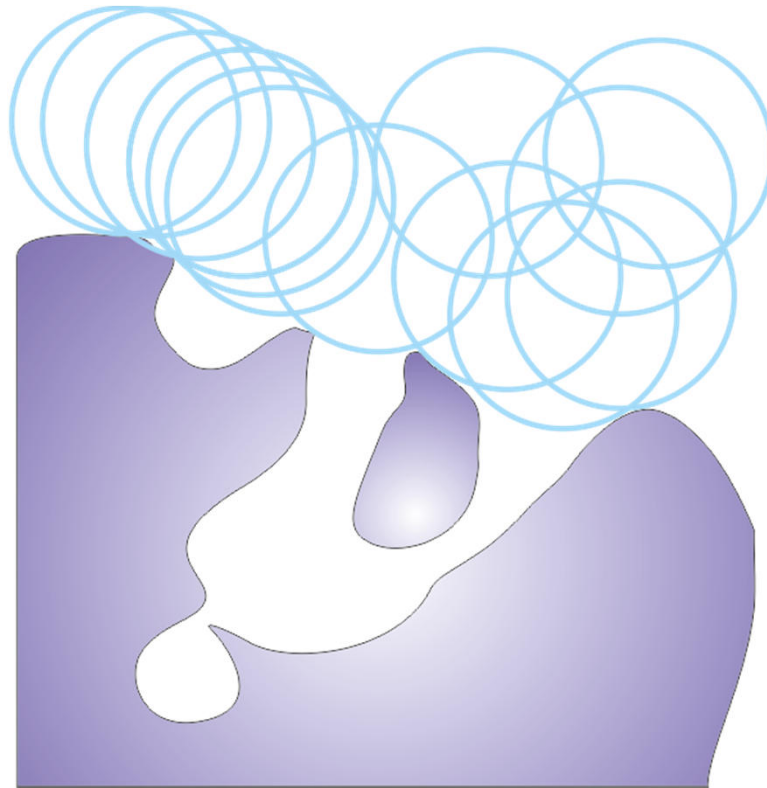
Identifikace kapes a dutin

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



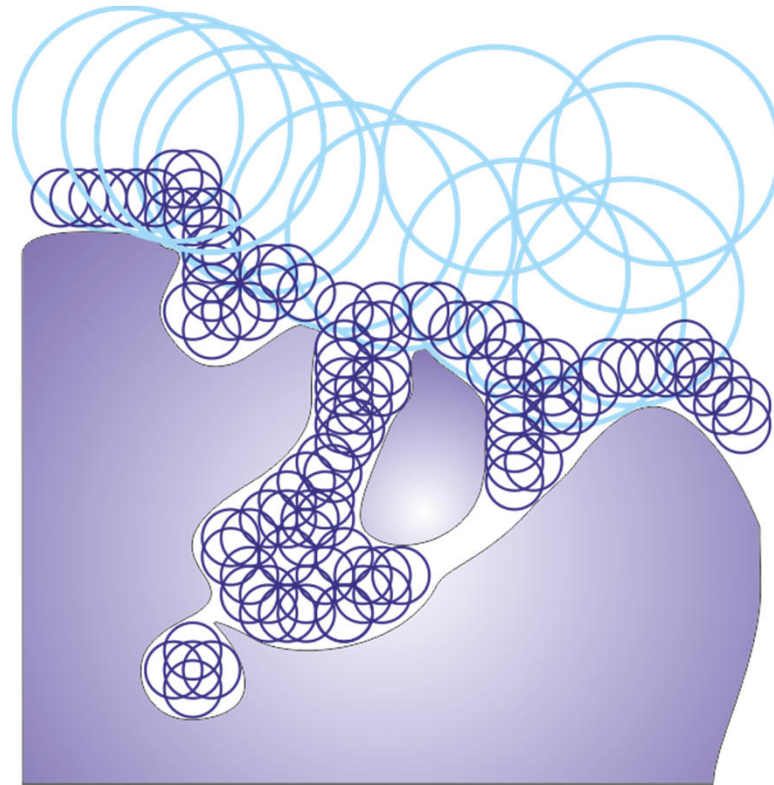
Identifikace kapes a dutin

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



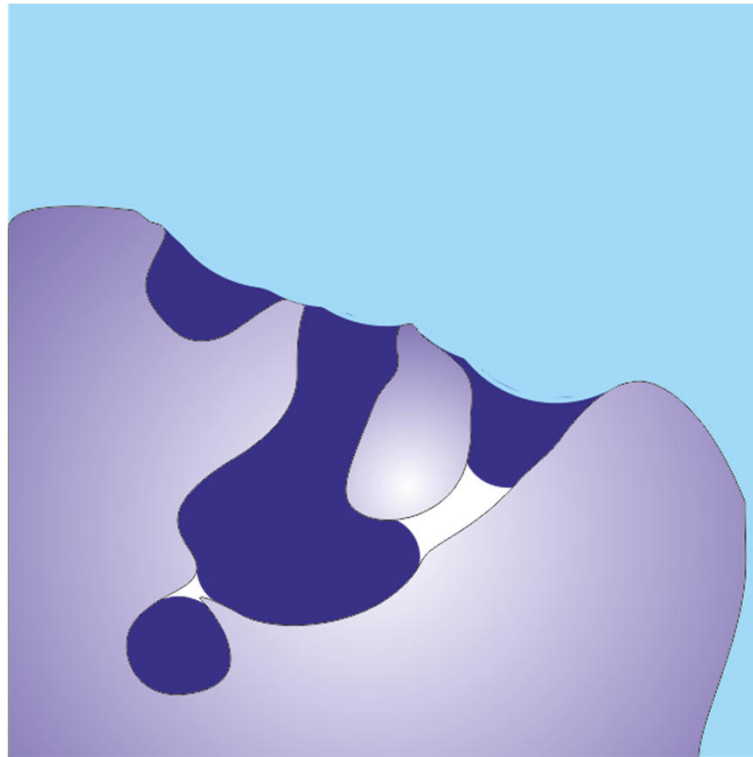
Identifikace kapes a dutin

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



Identifikace kapes a dutin

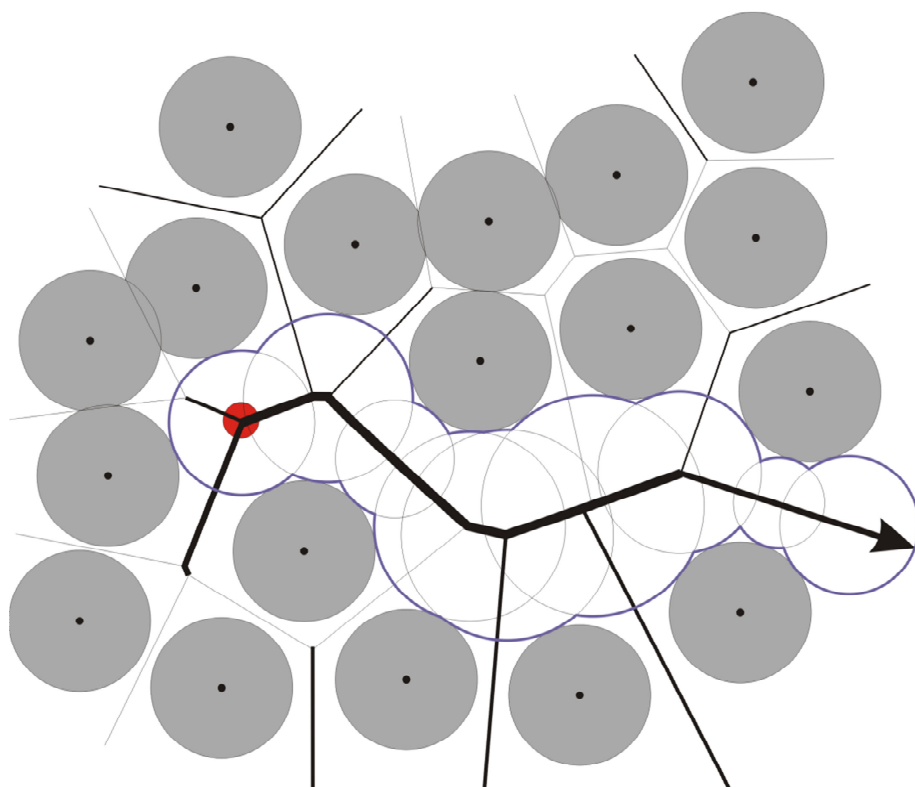
- **přístupnost prostoru sondám o rozdílné velikosti**
 - kavity, kapsy či žlábký
 - nástroje: **3V**, HOLLOW, LIGSITE, PASS, SURFNET či **fpocket**



Identifikace tunelů

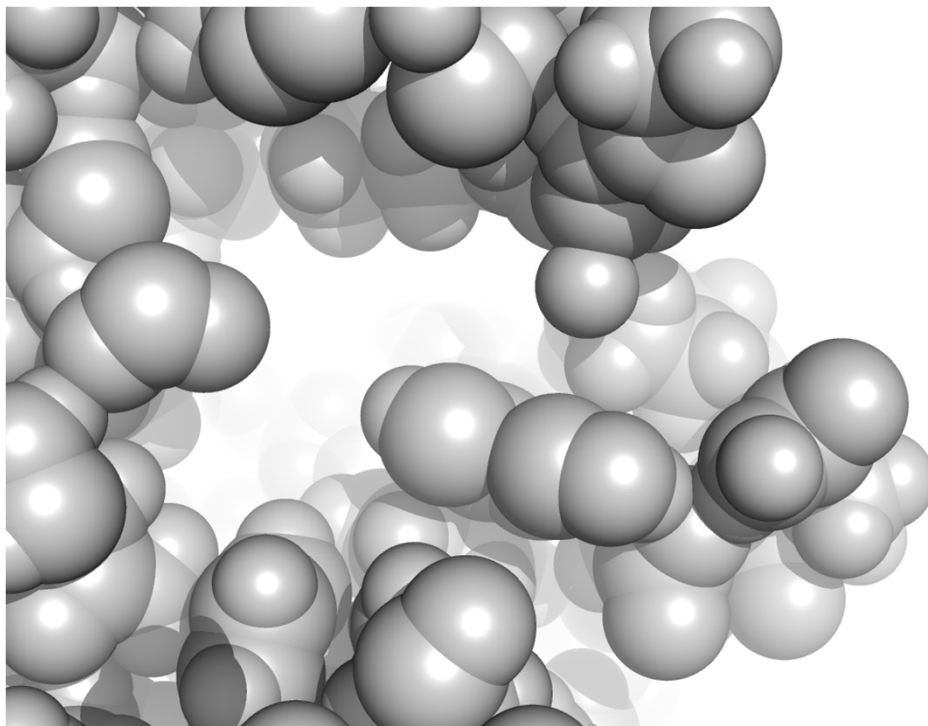
□ grafové algoritmy

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



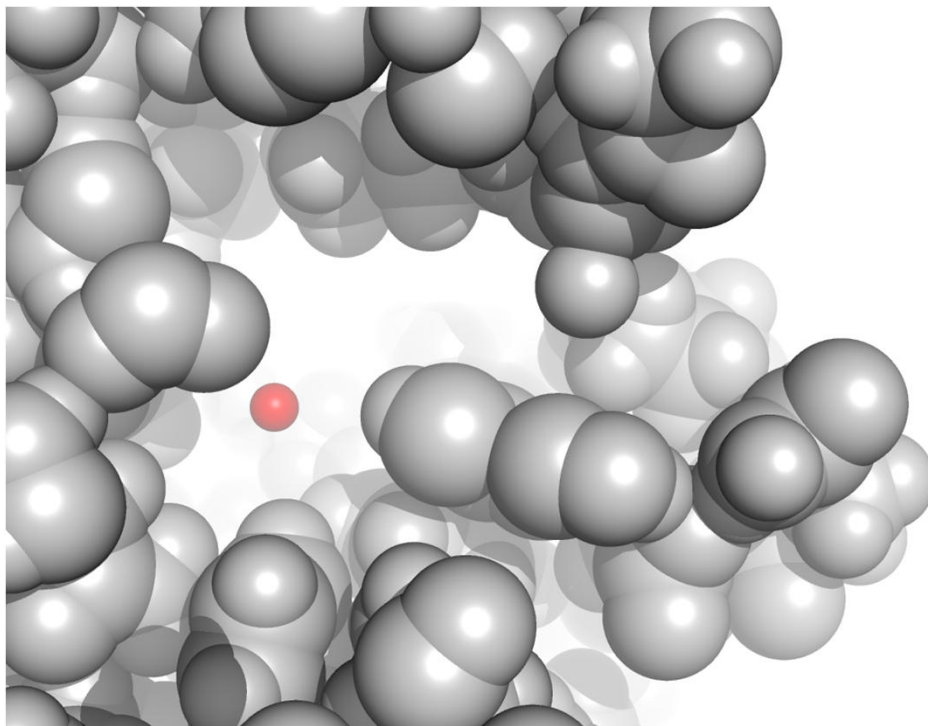
Identifikace tunelů

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



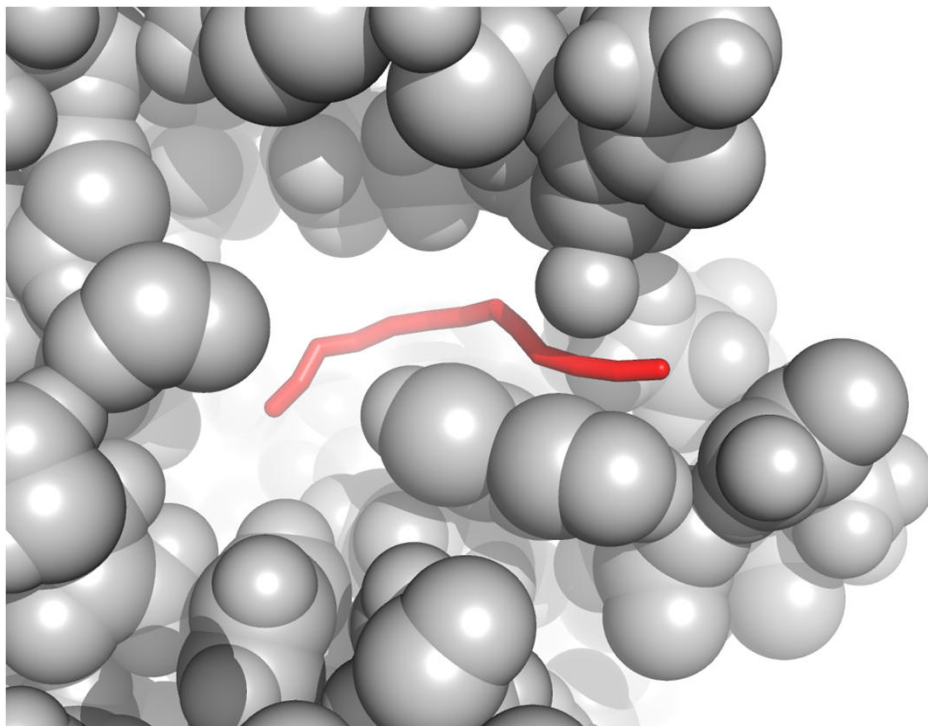
Identifikace tunelů

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



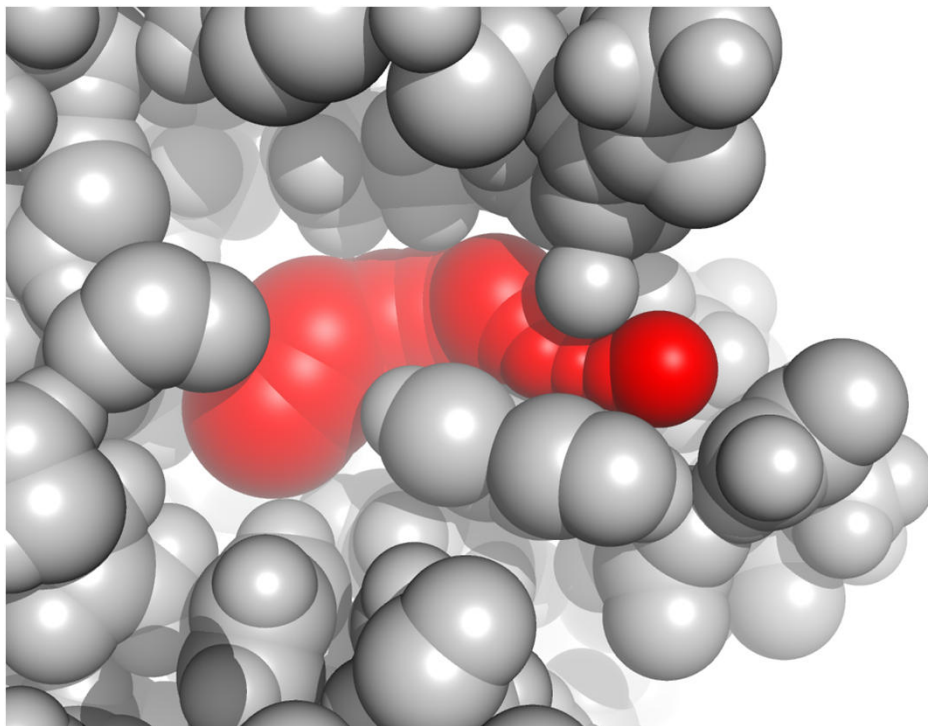
Identifikace tunelů

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

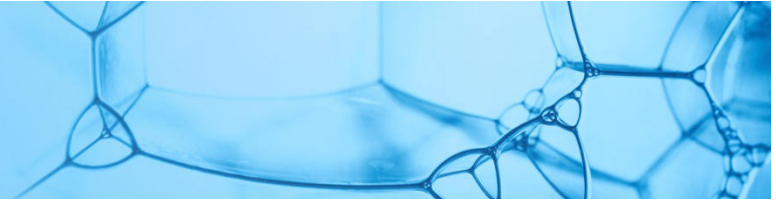


Identifikace tunelů

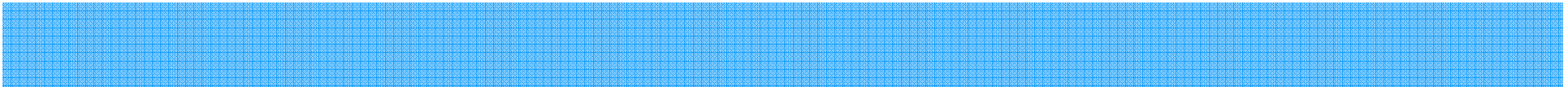
- **grafové algoritmy**
 - transportní cesty
 - nástroje: **CAVER**, MOLAXIS či MOLE



Hot-spoty pro vylepšení stability

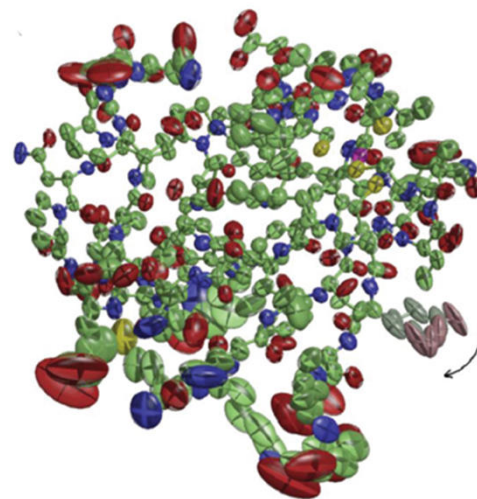


- ❑ **velmi flexibilní residua** – zanesení residuí, která strukturu znehyní
- ❑ **residua v transportních tunelech**

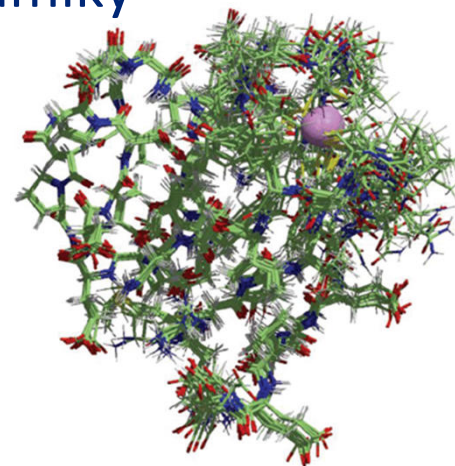


Identifikace flexibilních residuí

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

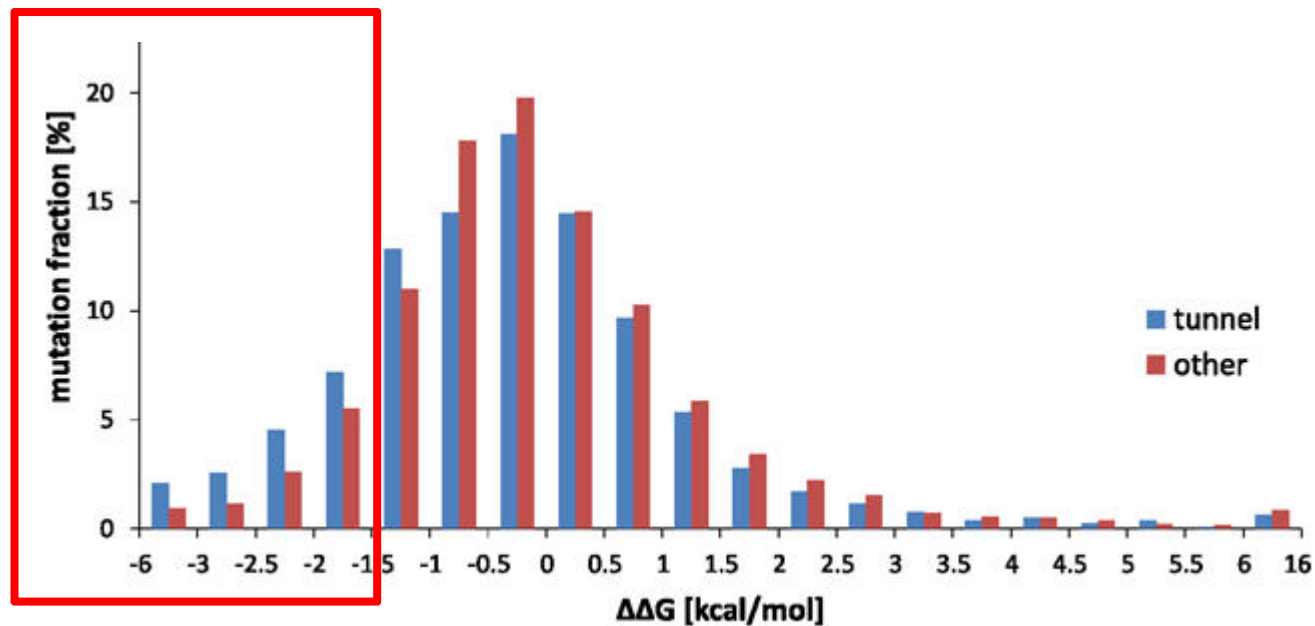


- **analýzou ansámbly** z NMR či molekulové dynamiky



Resiuda v tunelech

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



Modelování pro racionální design

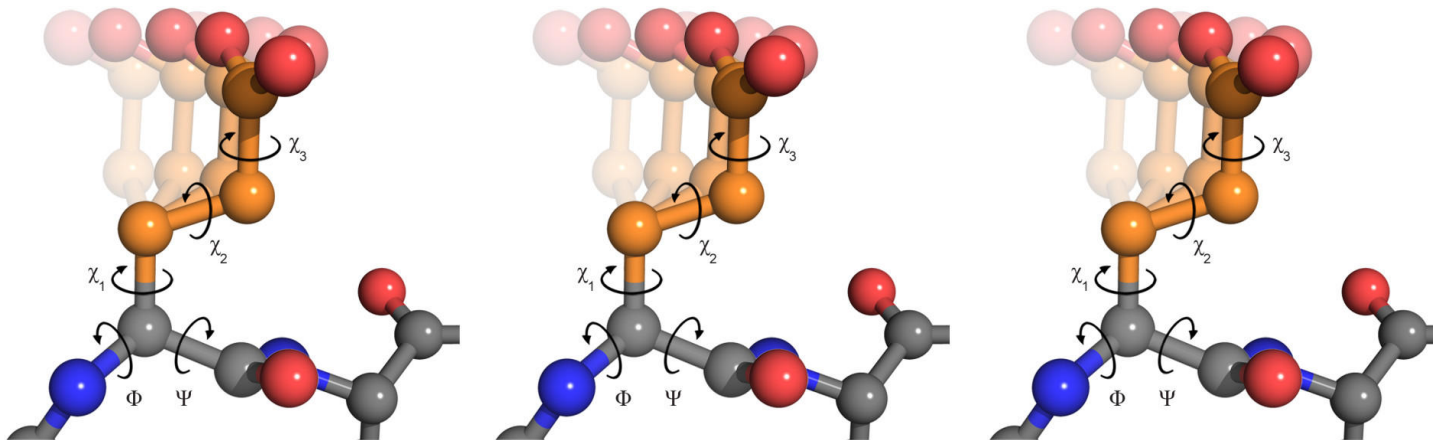


- **základem je predikce struktury modifikovaného proteinu**
- **následně je hodnocen vlivu mutace na**
 - stabilitu
 - katalytické vlastnosti

Predikce struktury mutantního proteinu

□ princip

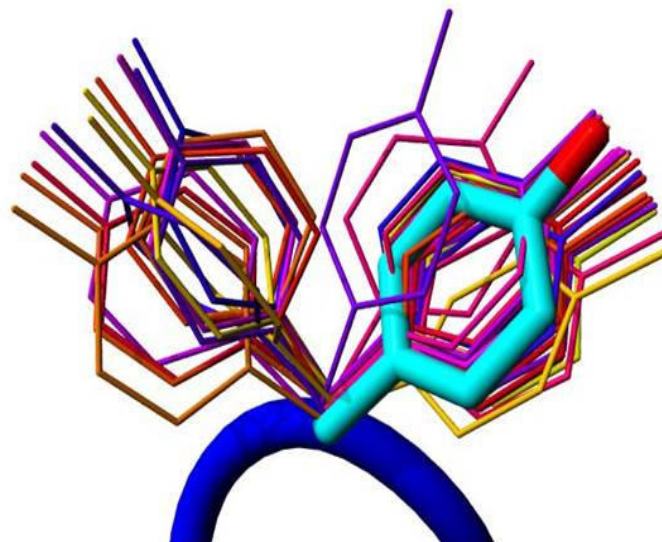
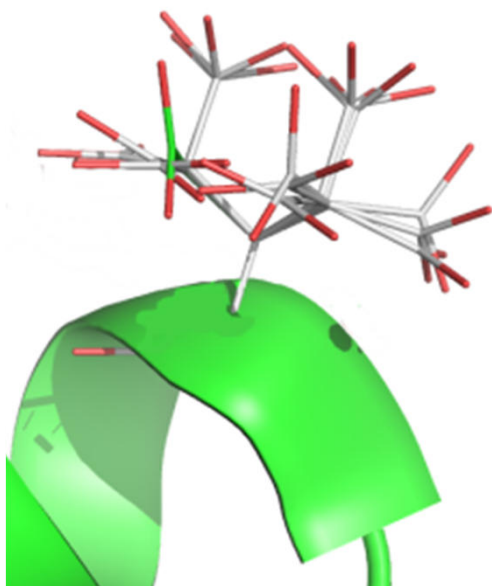
- mutované residuum je potřeba vložit do struktury v optimální konformaci vzhledem k jeho okolí a současně upravit konformace okolích residuí v důsledku mutace tak aby struktura měla co nejnižší energii – **těžký kombinatorický problém**



Predikce struktury mutantního proteinu

□ řešení

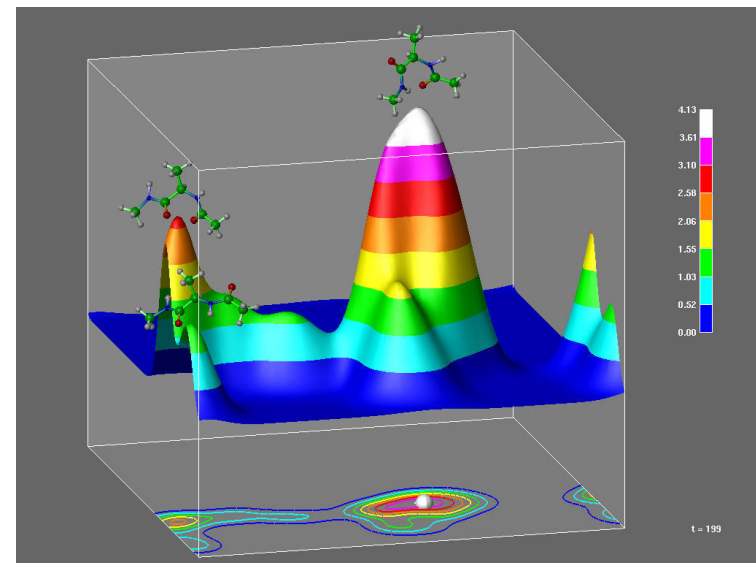
- reprezentace reziduí pomocí knihovny rotamerů (konformace běžně pozorované v sáde kvalitních X-ray struktur)



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/mechanizmu transportu**
 - grafové algoritmy, molekulová dynamika, ...

Osnova

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

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°C $\tau_{1/2} \sim 5 \text{ min}$

Racionální design stabilnějších enzymů

☐ metoda GSSM

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

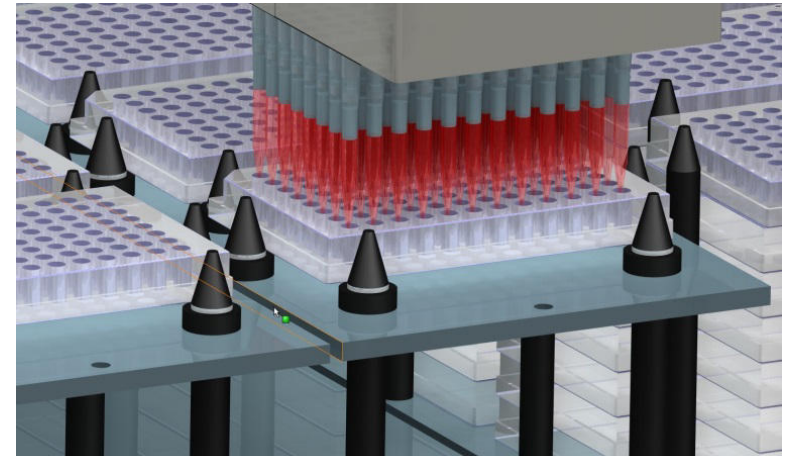
☐ stabilizace DhaA

- 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

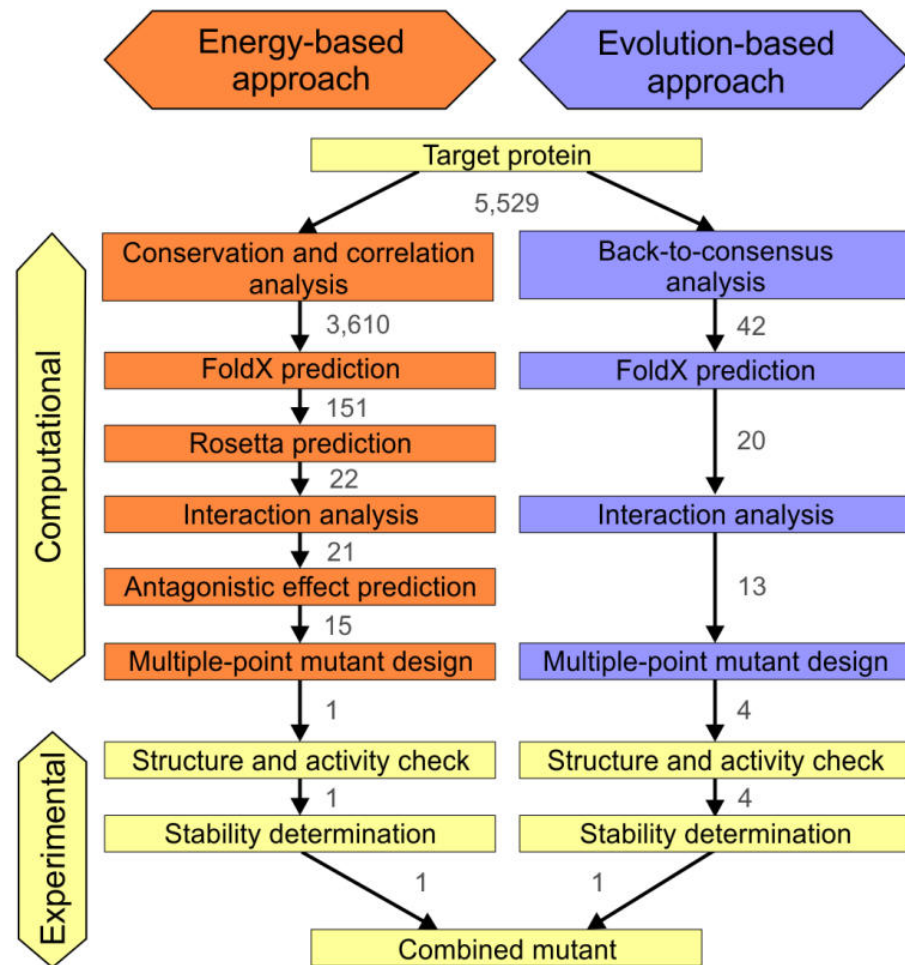
$$T_m = 67^\circ\text{C} \text{ a } \tau_{1/2} = 36 \text{ h}$$



Racionální design stabilnějších enzymů

□ výpočetní metoda FireProt

- vyvinuto na MU
- strukturní a sekvenční analýzy



Metoda Fireprot

Energy-based
approach

Metoda Fireprot

Energy-based
approach

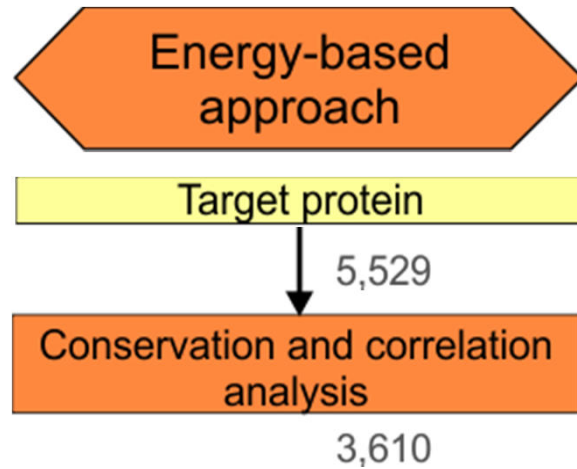
Target protein

5,529

- 291 pozicí X 19 možných mutací
- => **5 529 jednobodových mutantů**



Metoda Fireprot

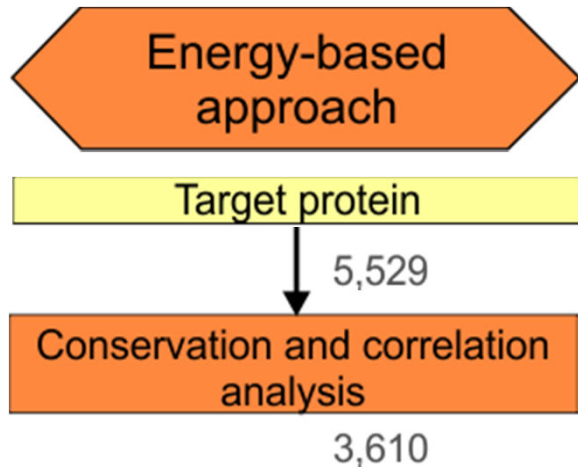


- evoluční analýza příbuzných proteinů

A sequence logo visualization showing conserved residues across multiple protein sequences. The residues are color-coded by their conservation level, with red indicating high conservation and other colors (green, blue, yellow, purple) indicating varying degrees of conservation. The sequences are aligned to show conserved positions across different proteins.

M	S	P	D	E	C	A	A	Y	N	A	P	F	P	D	K	G	H	R	A	A	L	R	A	F	P	L	M
L	S	D	A	E	R	S	A	Y	D	A	P	F	P	D	E	S	Y	K	E	G	A	R	I	F	P	A	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	P	R	L
L	S	T	D	E	L	N	A	Y	D	A	P	F	P	T	E	A	H	K	A	G	V	R	Q	F	P	L	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	P	R	L
L	S	P	A	E	I	A	A	Y	E	A	P	F	P	T	P	D	Y	K	A	G	A	R	A	F	P	A	L
L	S	D	A	E	A	A	A	Y	G	A	P	F	P	D	Q	R	Y	K	A	G	V	R	R	F	P	E	L

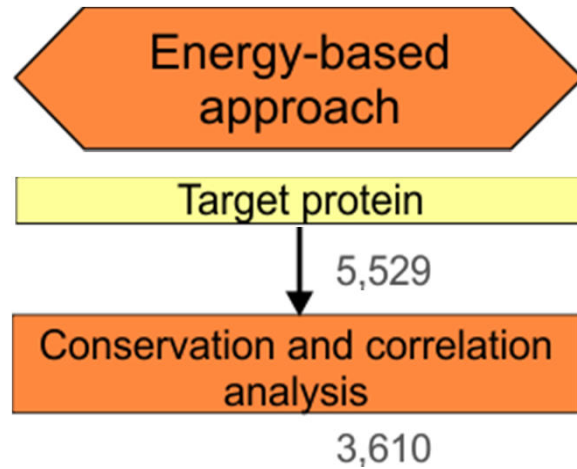
Metoda Fireprot



- evoluční analýza příbuzných proteinů



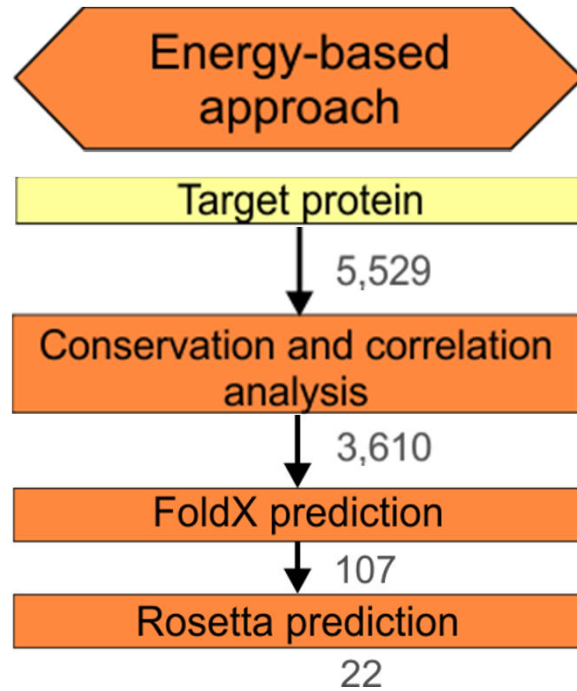
Metoda Fireprot



- 190 pozic bez evolučních restrikcí
- => **3 610 jednobodových mutantů**



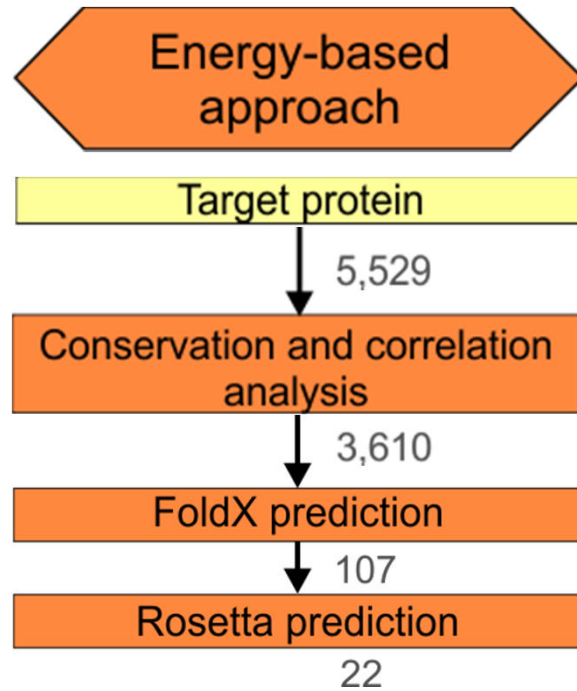
Metoda Fireprot



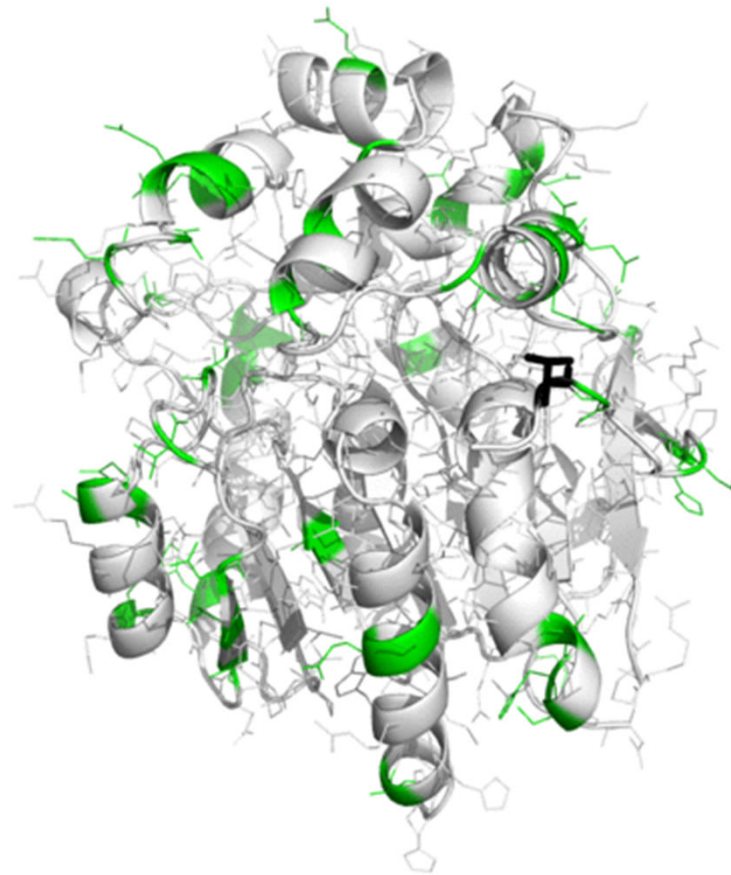
□ **FoldX:** 43 pozic; 107 stabilizujících mutací



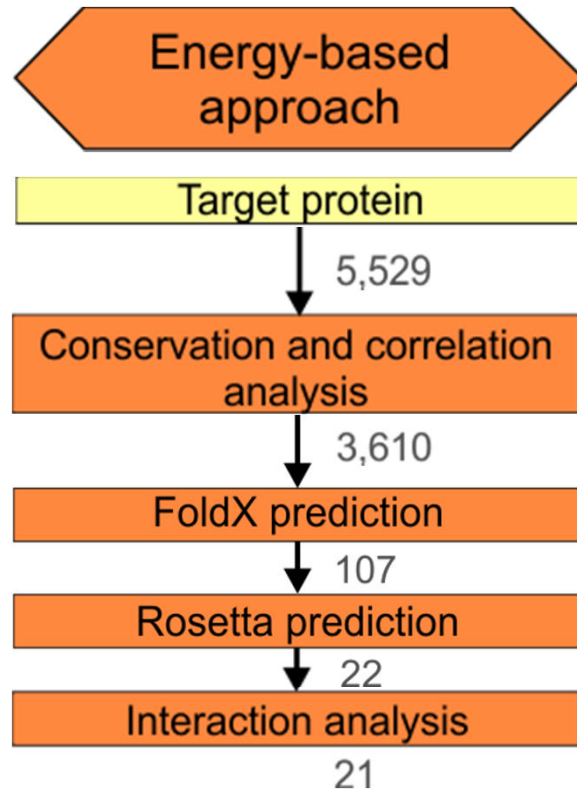
Metoda Fireprot



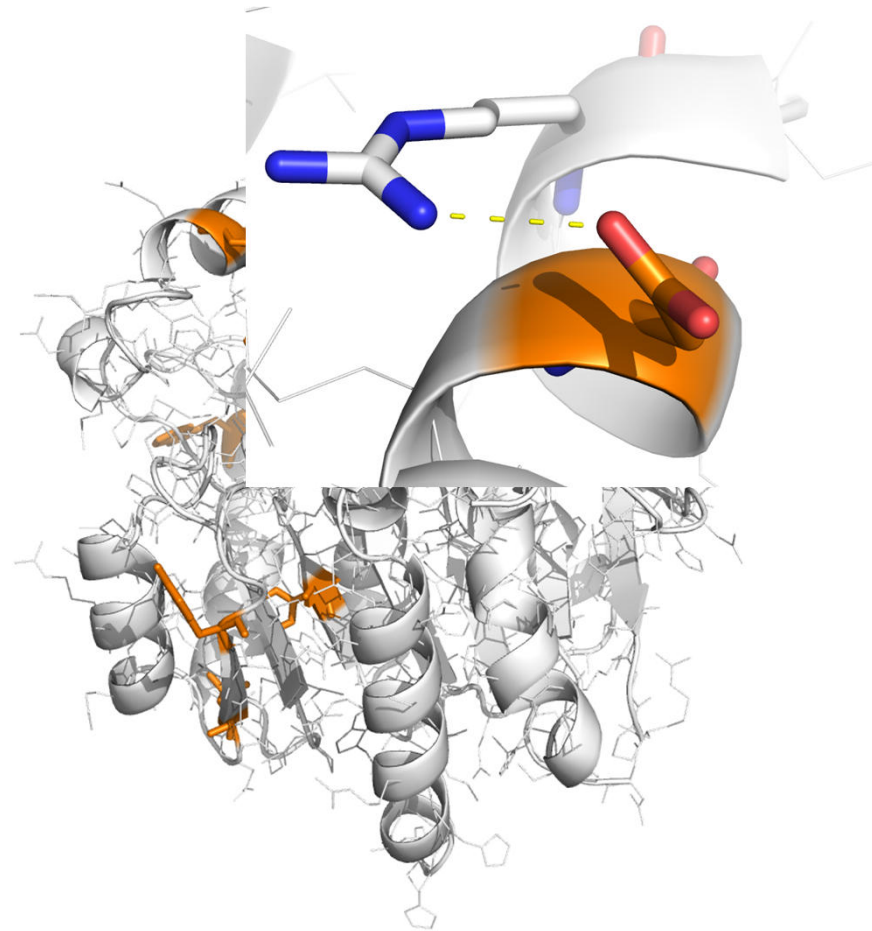
- ❑ **FoldX:** 43 pozic; 107 stabilizujících mutací
- ❑ **Rosetta:** 11 pozic; 22 stabilizujících mutací



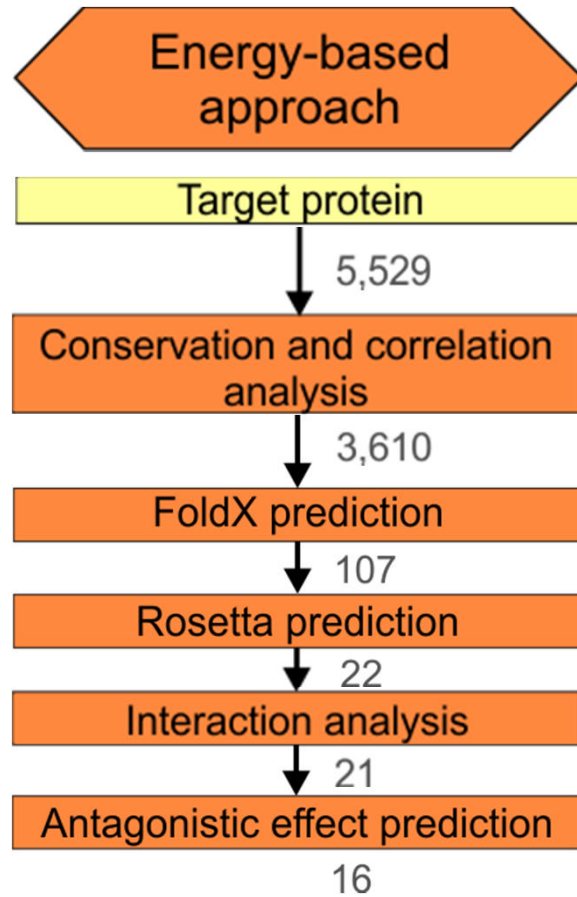
Metoda Fireprot



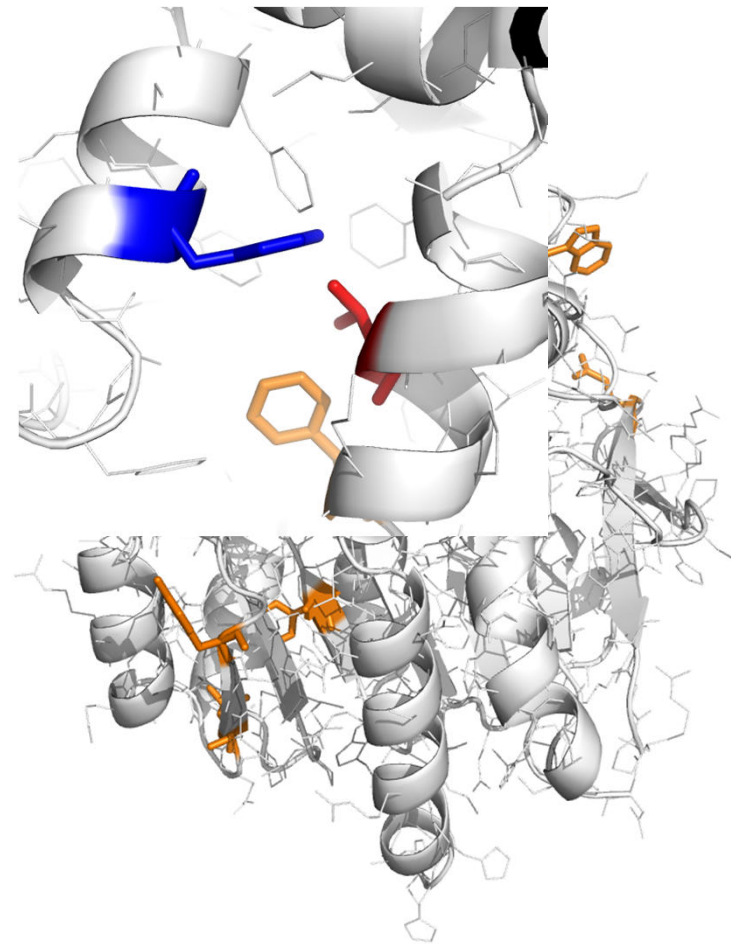
- ❑ 1 mutace rušící solný můstek vynechána



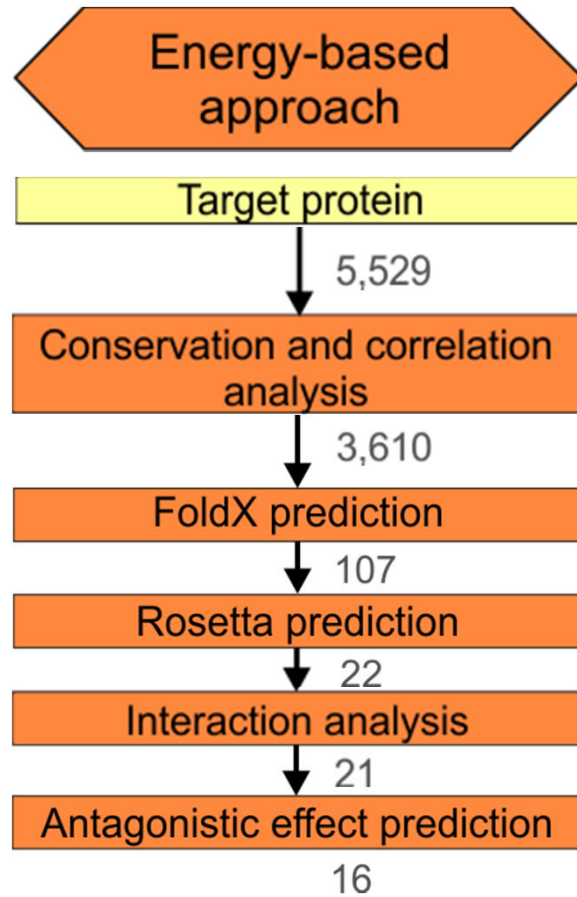
Metoda Fireprot



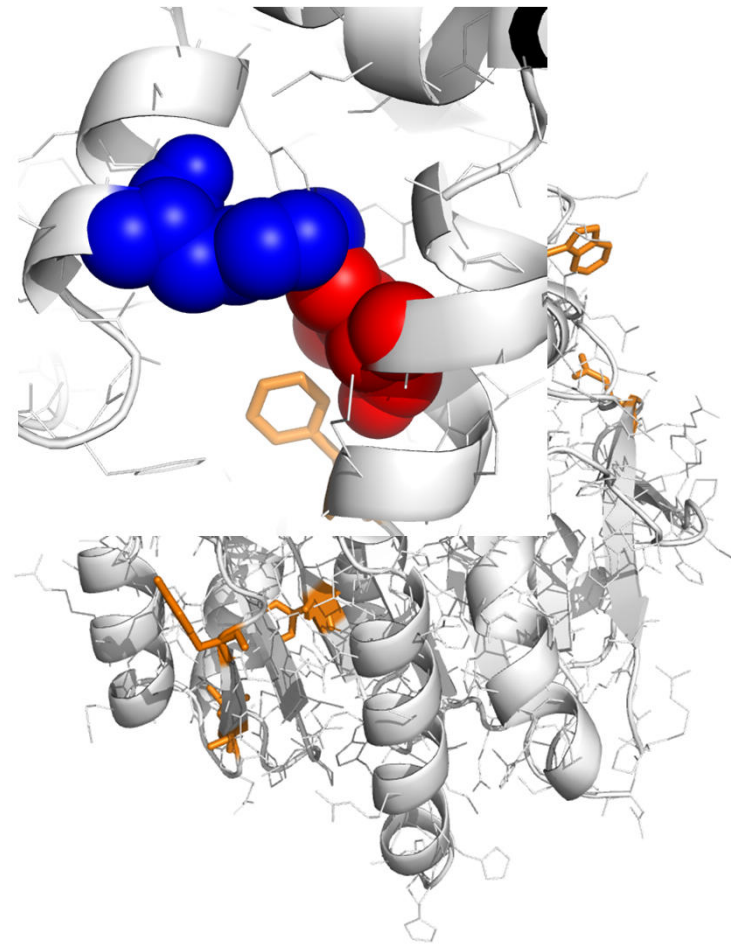
- 5 mutací interferujících s ostatními vynechány



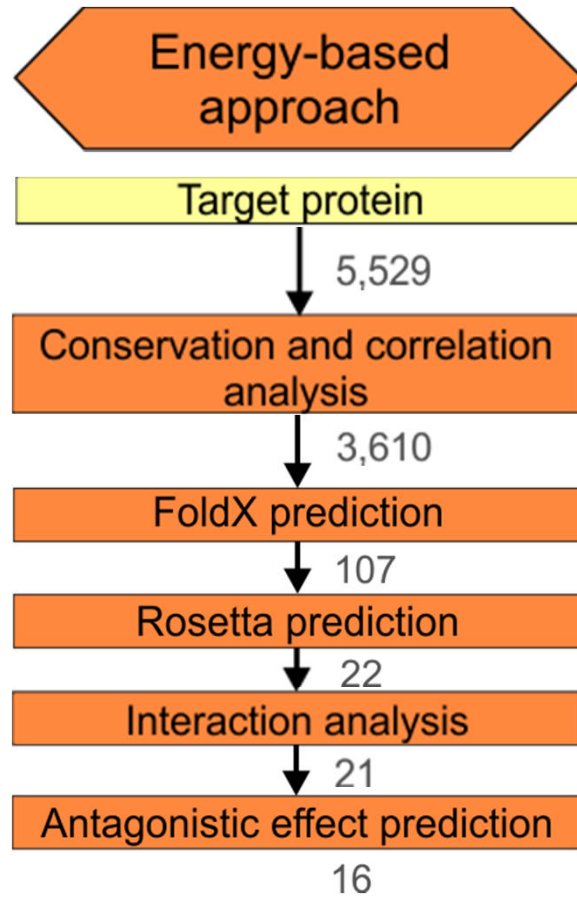
Metoda Fireprot



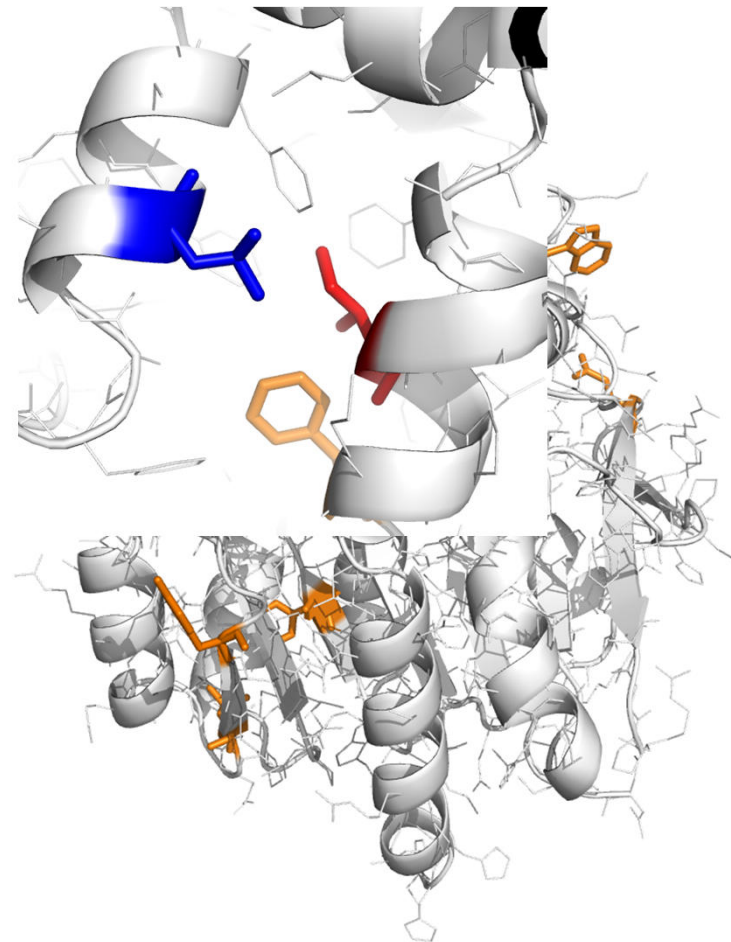
- 5 mutací interferujících s ostatními vynechány



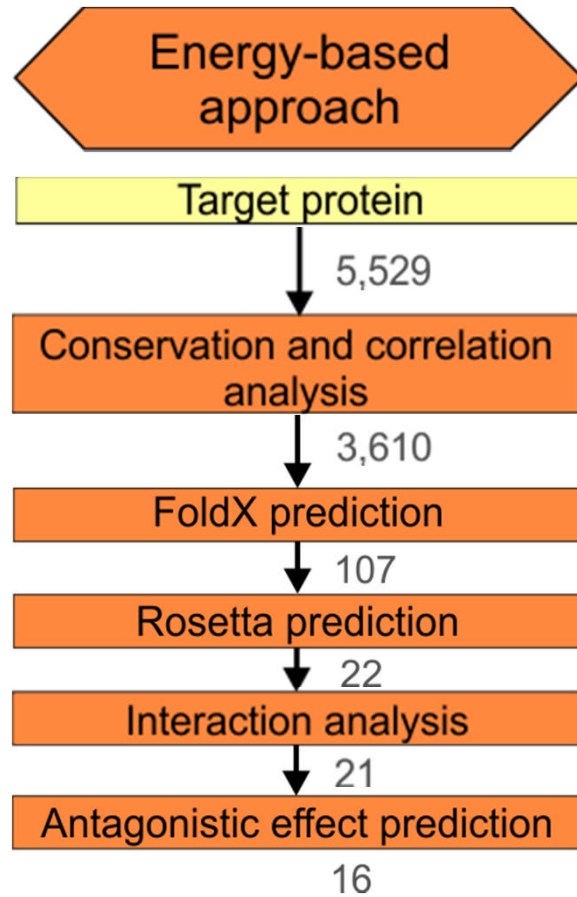
Metoda Fireprot



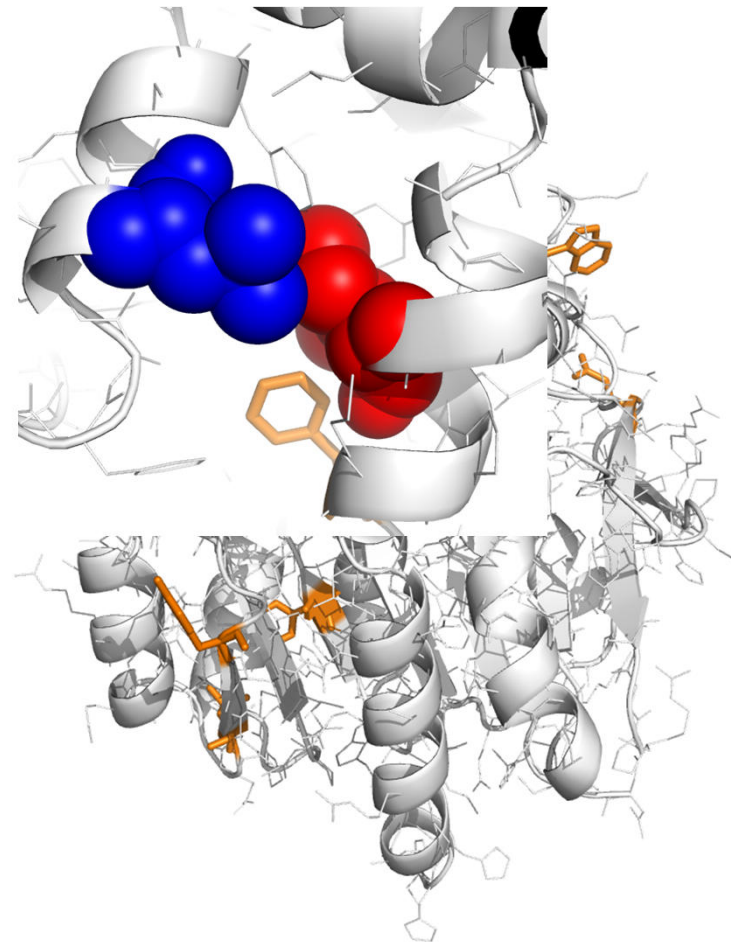
- 5 mutací interferujících s ostatními vynechány



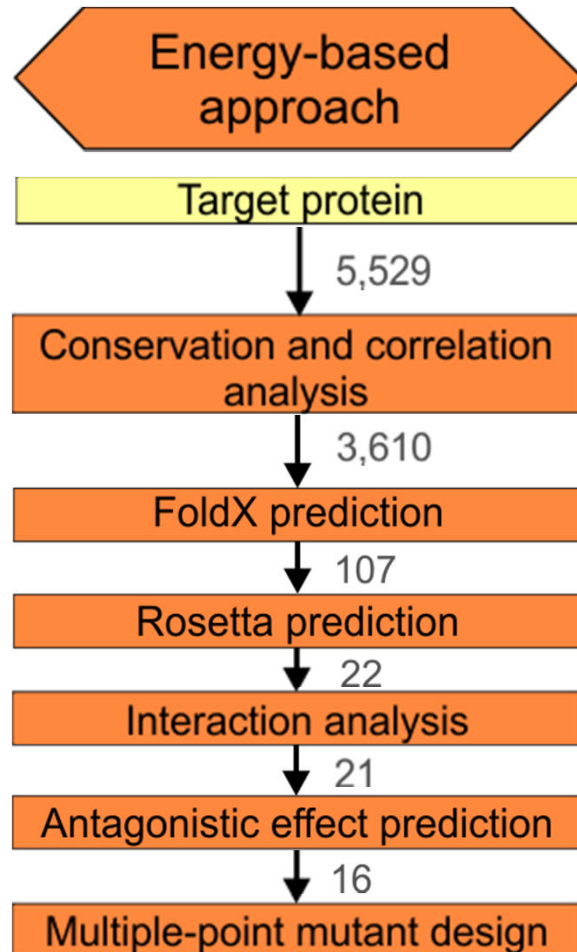
Metoda Fireprot



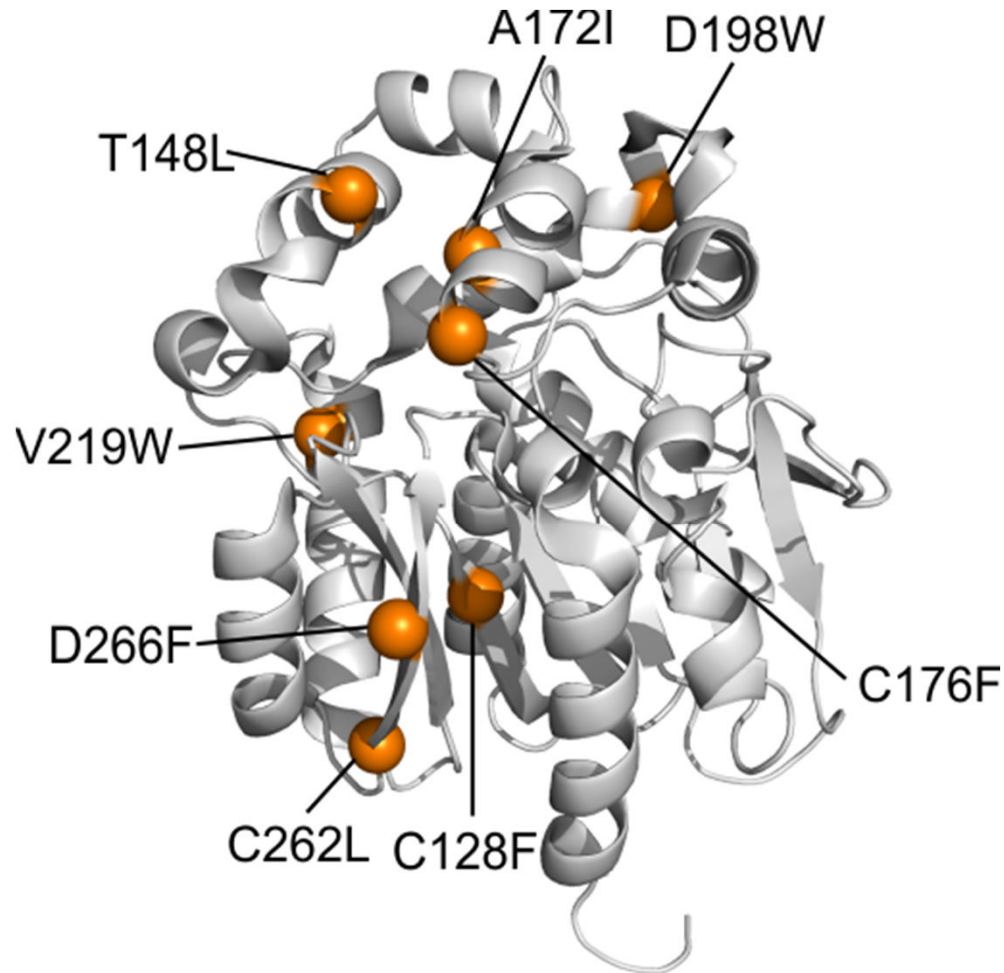
- 5 mutací interferujících s ostatními vynechány



Metoda Fireprot



1



Energy-based mutant

Metoda Fireprot

Evolution-based approach

M	S	P	D	E	C	A	A	Y	N	A	P	F	P	D	K	G	H	R	A	A	L	R	A	F	P	L	M
L	S	D	A	E	R	S	A	Y	D	A	P	F	P	D	E	S	Y	K	E	G	A	R	I	F	P	A	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	P	R	L
L	S	T	D	E	L	N	A	Y	D	A	P	F	P	T	E	A	H	K	A	G	V	R	Q	F	P	L	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	P	R	L
L	S	P	A	E	I	A	A	Y	E	A	P	F	P	T	P	D	Y	K	A	G	A	R	A	F	P	A	L
L	S	D	A	E	A	A	A	Y	G	A	P	F	P	D	Q	R	Y	K	A	G	V	R	R	F	P	E	L

Metoda Fireprot

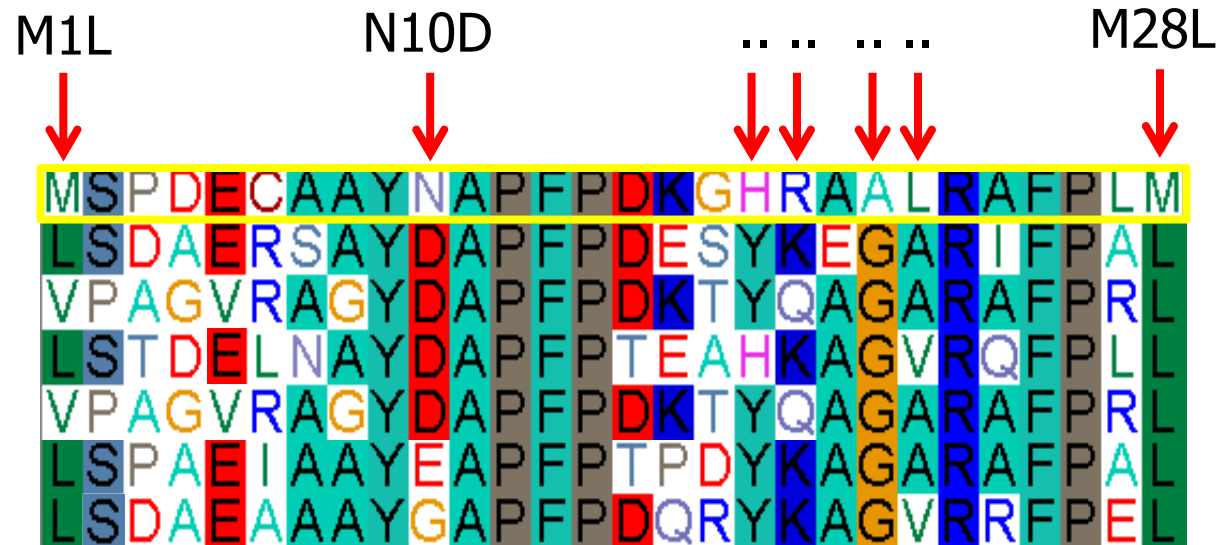
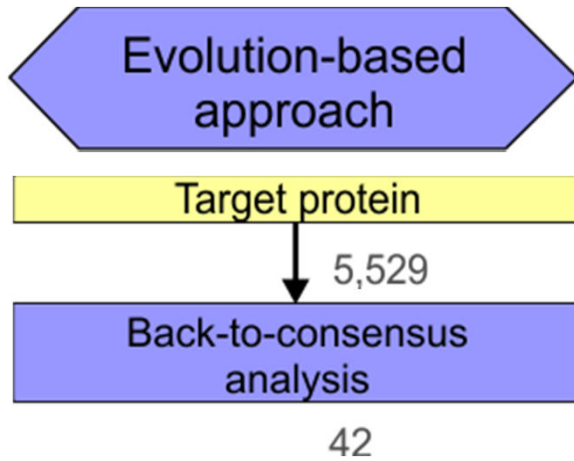
Evolution-based approach

Target protein

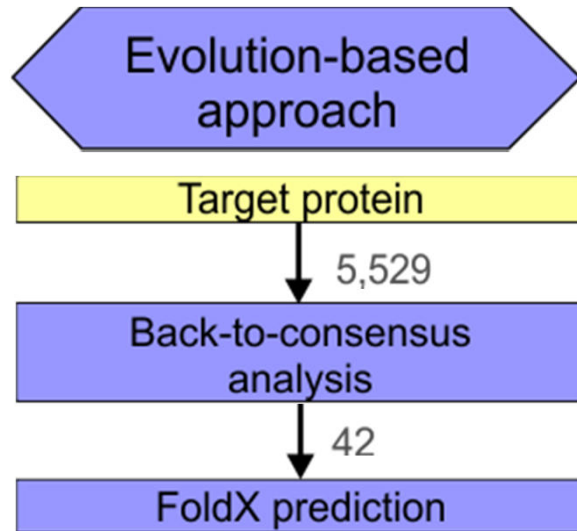
5,529

M	S	P	D	E	C	A	A	Y	N	A	P	F	P	D	K	G	H	R	A	A	L	R	A	F	F	L	M
L	S	D	A	E	R	S	A	Y	D	A	P	F	P	D	E	S	Y	K	E	G	A	R	I	F	P	A	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	F	R	L
L	S	T	D	E	L	N	A	Y	D	A	P	F	P	T	E	A	H	K	A	G	V	R	Q	F	F	L	L
V	P	A	G	V	R	A	G	Y	D	A	P	F	P	D	K	T	Y	Q	A	G	A	R	A	F	F	R	L
L	S	P	A	E	I	A	A	Y	E	A	P	F	P	T	P	D	Y	K	A	G	A	R	A	F	F	A	L
L	S	D	A	E	A	A	A	Y	G	A	P	F	P	D	Q	R	Y	K	A	G	V	R	R	F	F	E	L

Metoda Fireprot



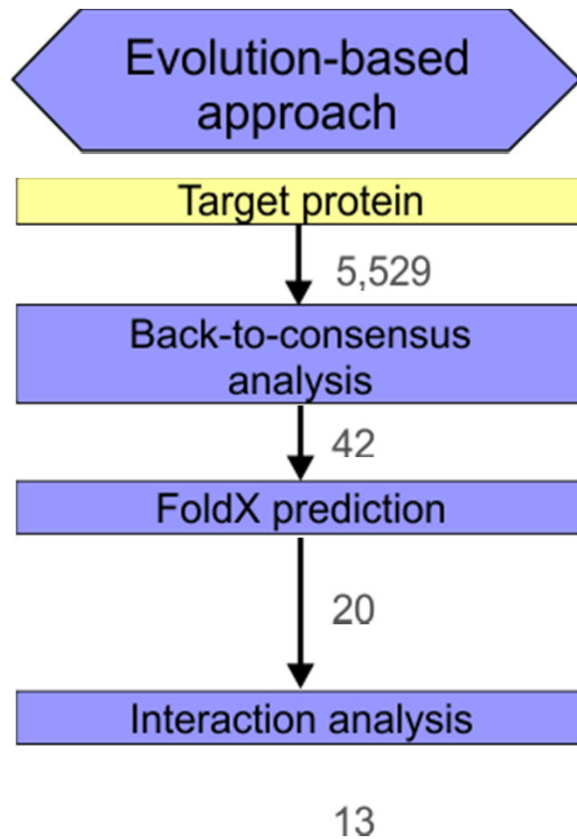
Metoda Fireprot



20

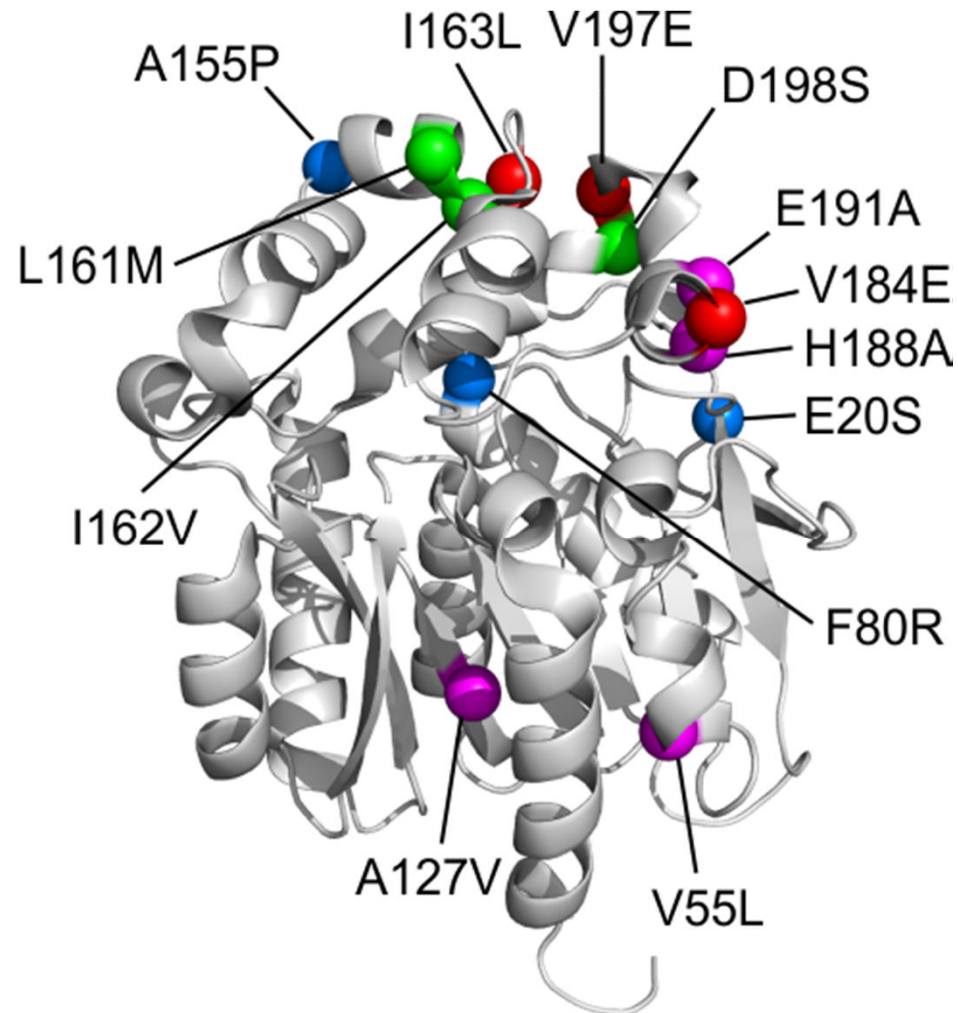
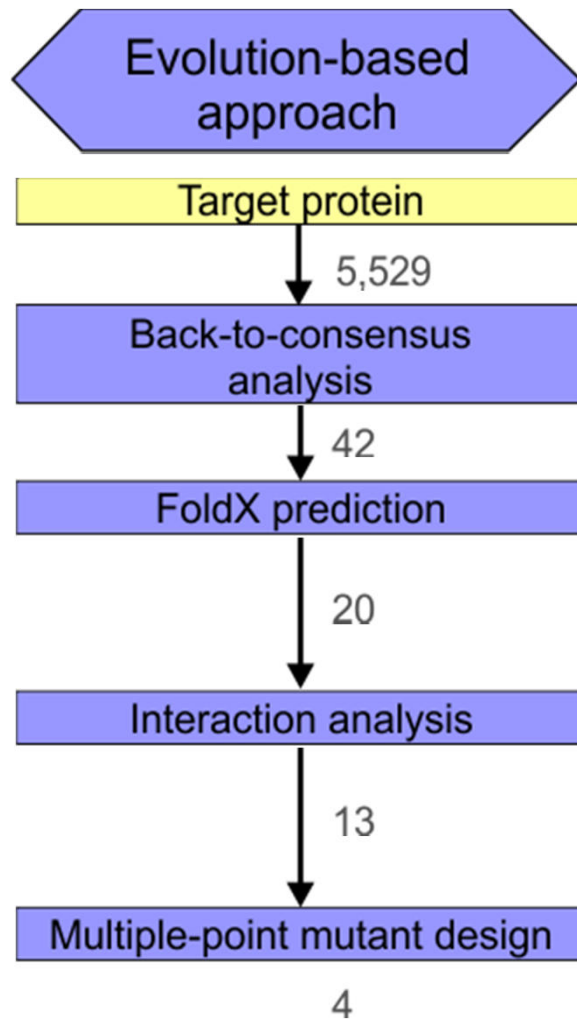
- **FoldX:** 22 mutací potenciálně destabilizujících

Metoda Fireprot



- ❑ 7 mutací rušící důležité interakce
- ❑ 2 solné můstky
- ❑ 5 vodíkových vazeb

Metoda Fireprot



Evolution-based mutants

Racionální design stabilnějších enzymů

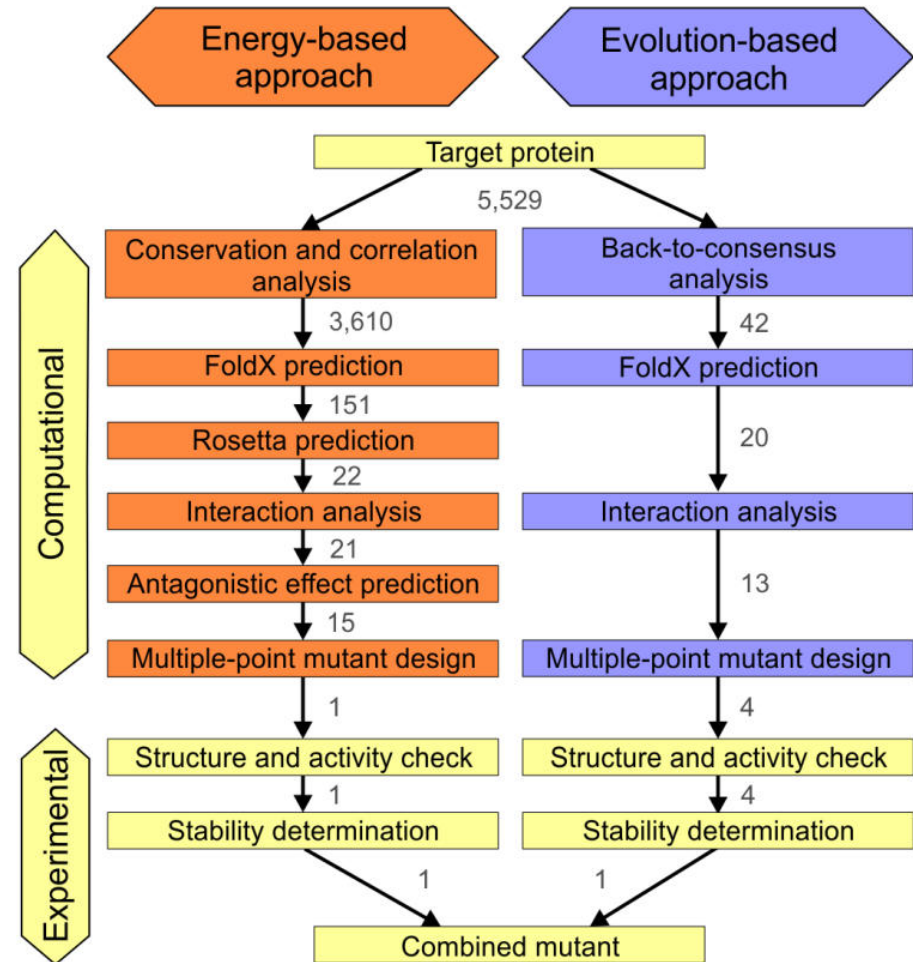
☐ stabilizace DhaA

- 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

☐ závěry

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

Osnova

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

Hledání aktivních látek

□ **cíl**

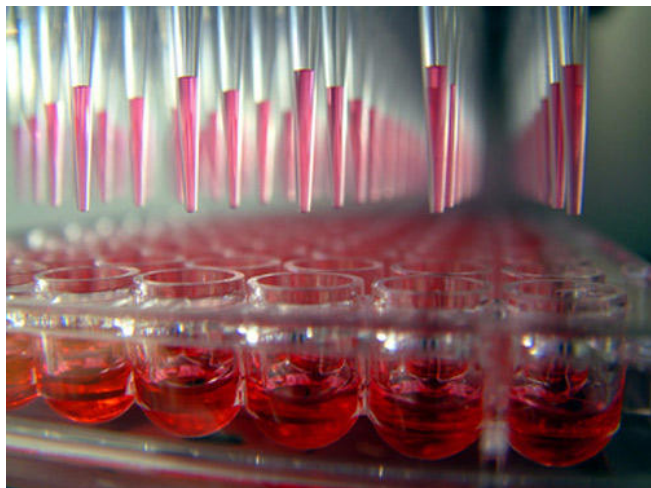
- nalezení specifických netoxických inhibitorů farmakologicky relevantních cílů

□ **dva alternativní přístupy**

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

Hledání aktivních látek

High-throughput screening



Hledání aktivních látek

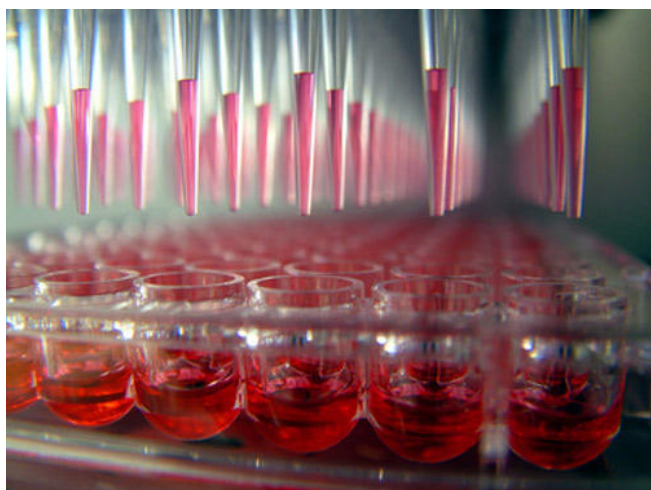
High-throughput screening



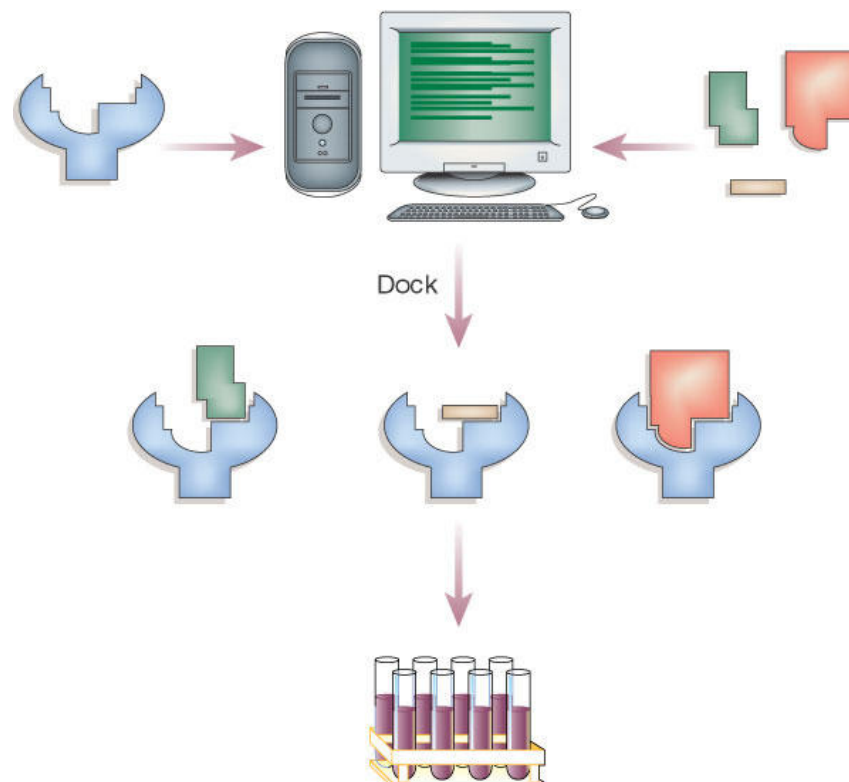
- **falešně pozitivní výsledky** –toxicita, reakce s složkami detekční essey, ...
- **falešně negativní výsledky** – špatná rozpustnost, ...

Hledání aktivních látek

High-throughput screening



Virtuální screening



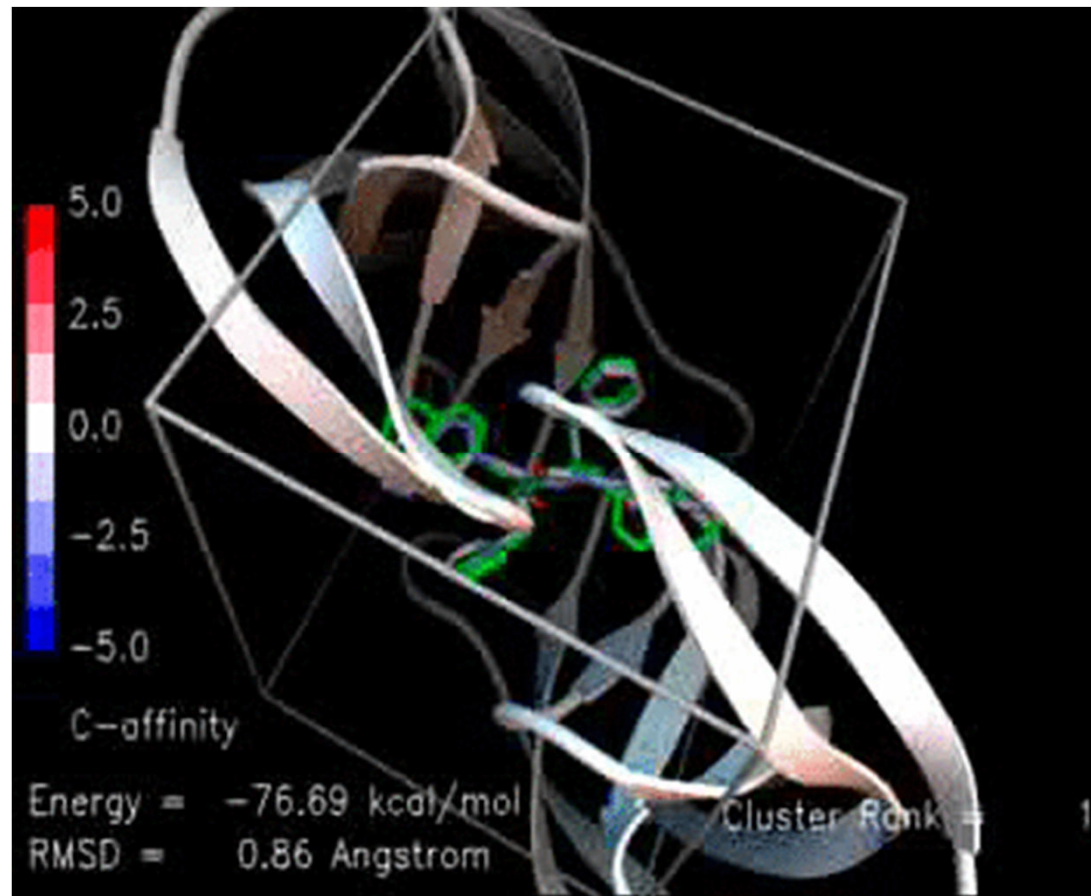
Osnova

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

Molekulové dokování

□ dvousložkový proces

- hledání
- hodnocení



Molekulové dokování

□ ideální postup

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

□ nutnost mnoha aproximací:

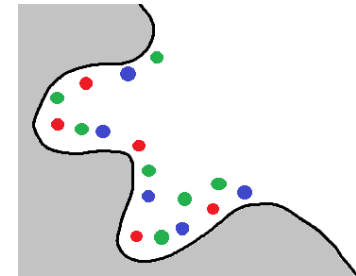
- zjednodušená reprezentace receptoru
- omezená pohyblivost ligandu
- chytré prohledávací algoritmy
- rychlé hodnotící funkce



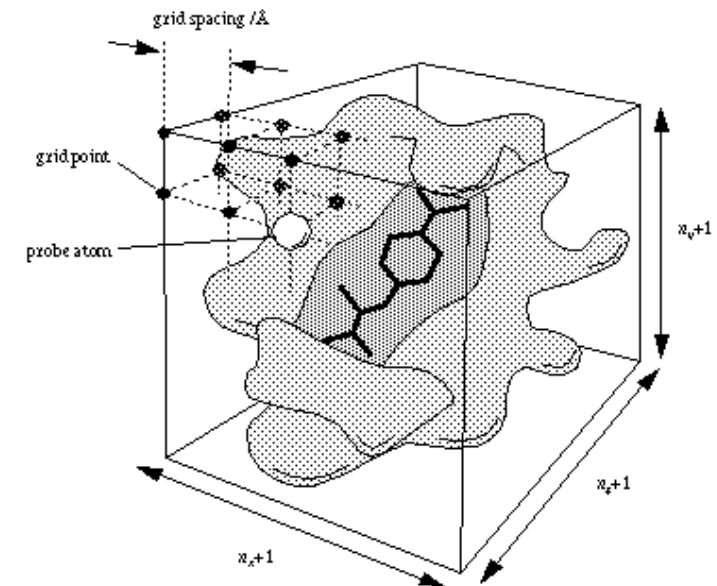
Reprezentace receptoru

□ prohledávána pouze relevantní část receptoru

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



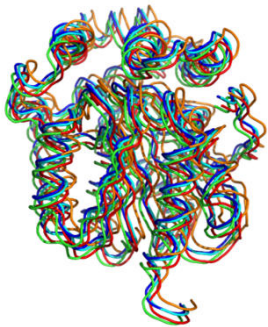
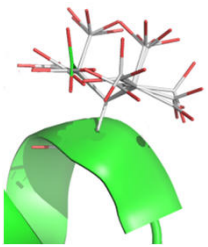
- **mřížková reprezentace** – vazebné místo pokryto pravidelnou mřížkou nesoucí informaci o interakci zkušebního atomu daném bodě s atomy receptoru



Reprezentace 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 ansámbly struktur** – několik krystalových struktur, NMR ansámblů či trajektorie z MD simulace



Reprezentace ligandu



□ běžně použity všechny atomy

- nepolární vodíkové atomy mohou být sjednoceny s uhlíkovými atomy, což urychluje výpočty

□ pohyblivost

- pouze rotace kolem jednoduchých vazeb
- **doking předpřipravené knihovny konformací ligandu** – pouze pro relativně rigidní ligandy vzhledem k exponenciálnímu nárůstu 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

Molekulové dokování - hledání



□ geometrické a kombinatorické postupy

- „matching“ či „fragment-based“ algoritmy
- 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

- Monte Carlo či genetické algoritmy
- 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

Geometrické postupy



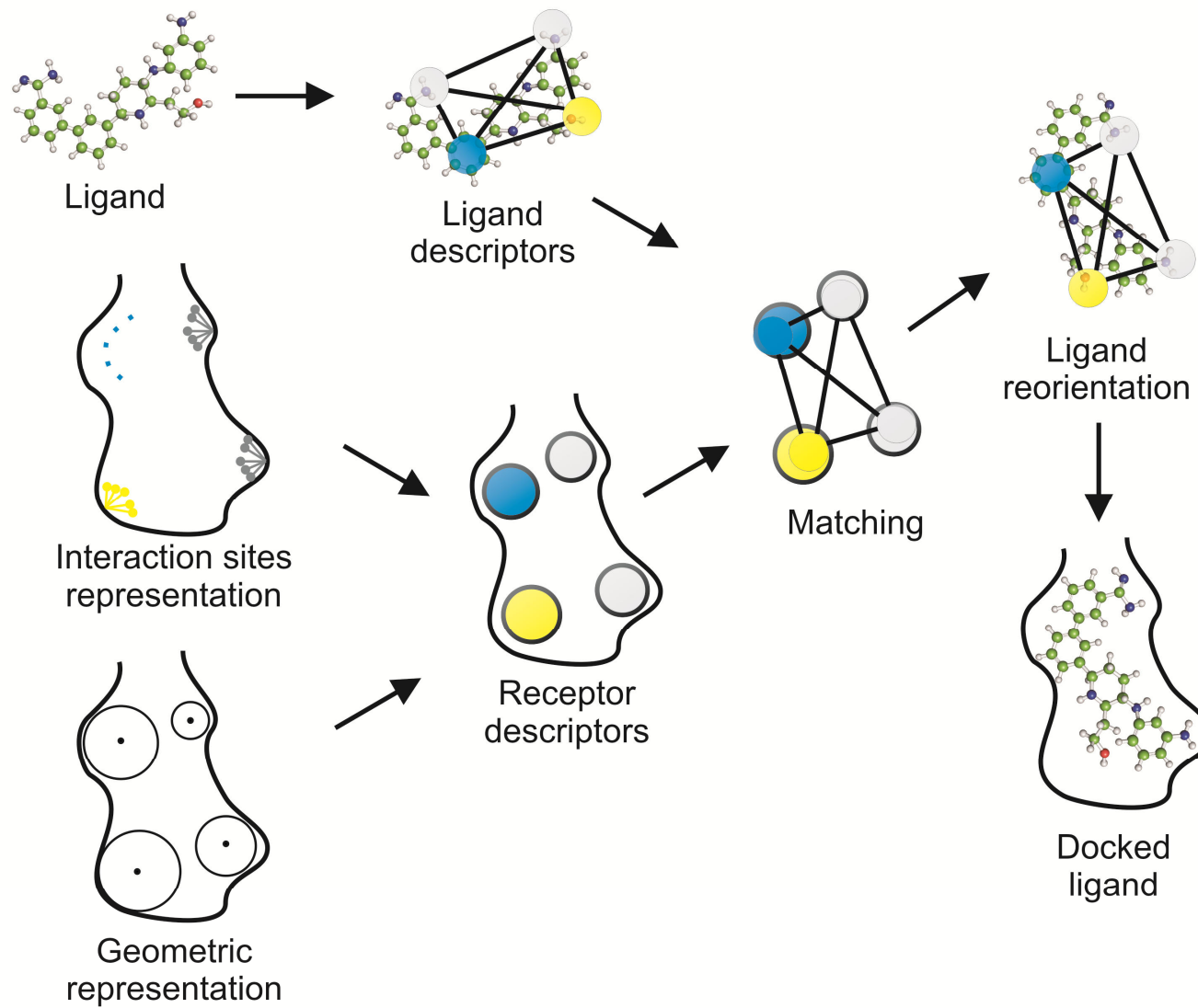
□ „matching“ algoritmus

- 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

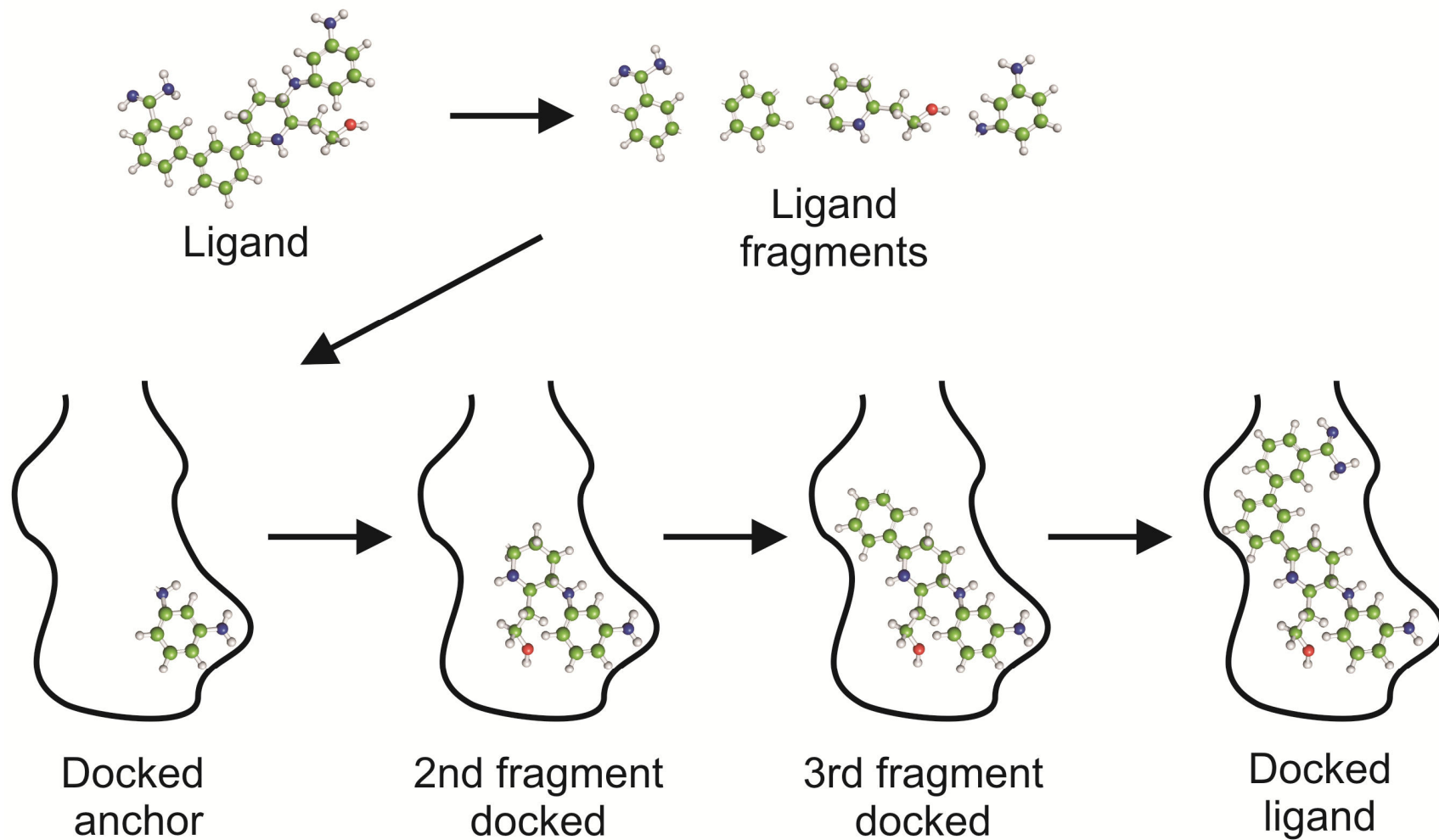


Geometrické postupy



- **„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



Stochastické energetické postupy



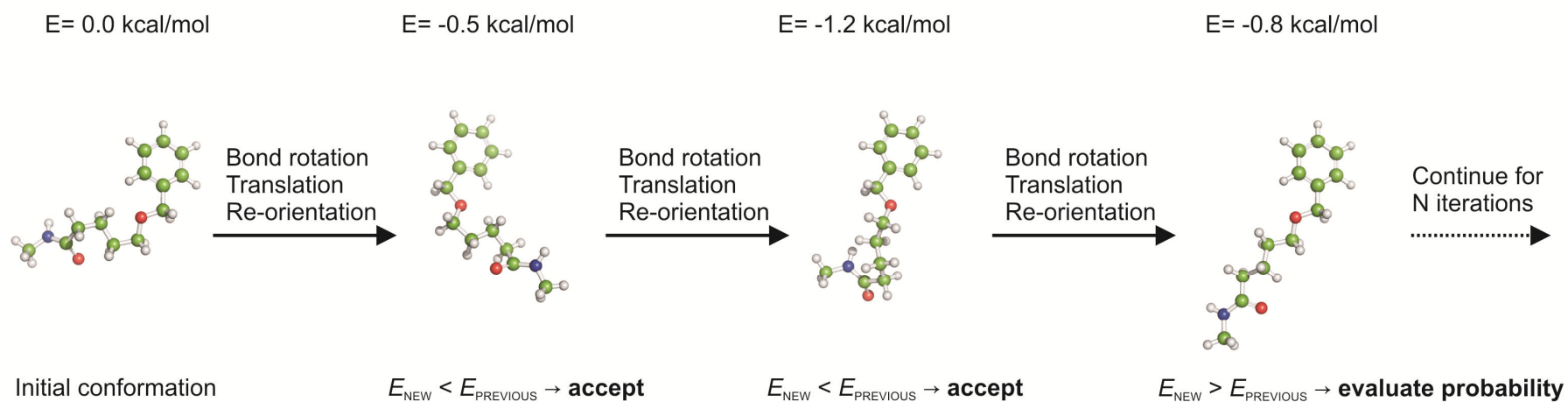
□ Monte Carlo algoritmus

- 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

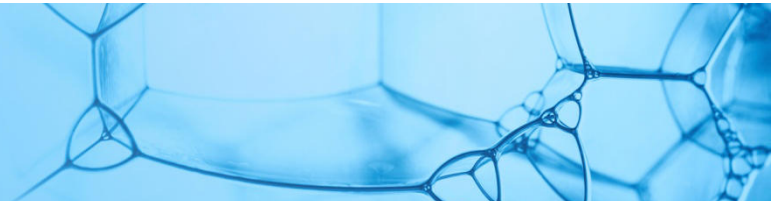
□ nástroje

- ICM, Glide ...

Stochastické energetické postupy



Stochastické energetické postupy



□ genetický algoritmus

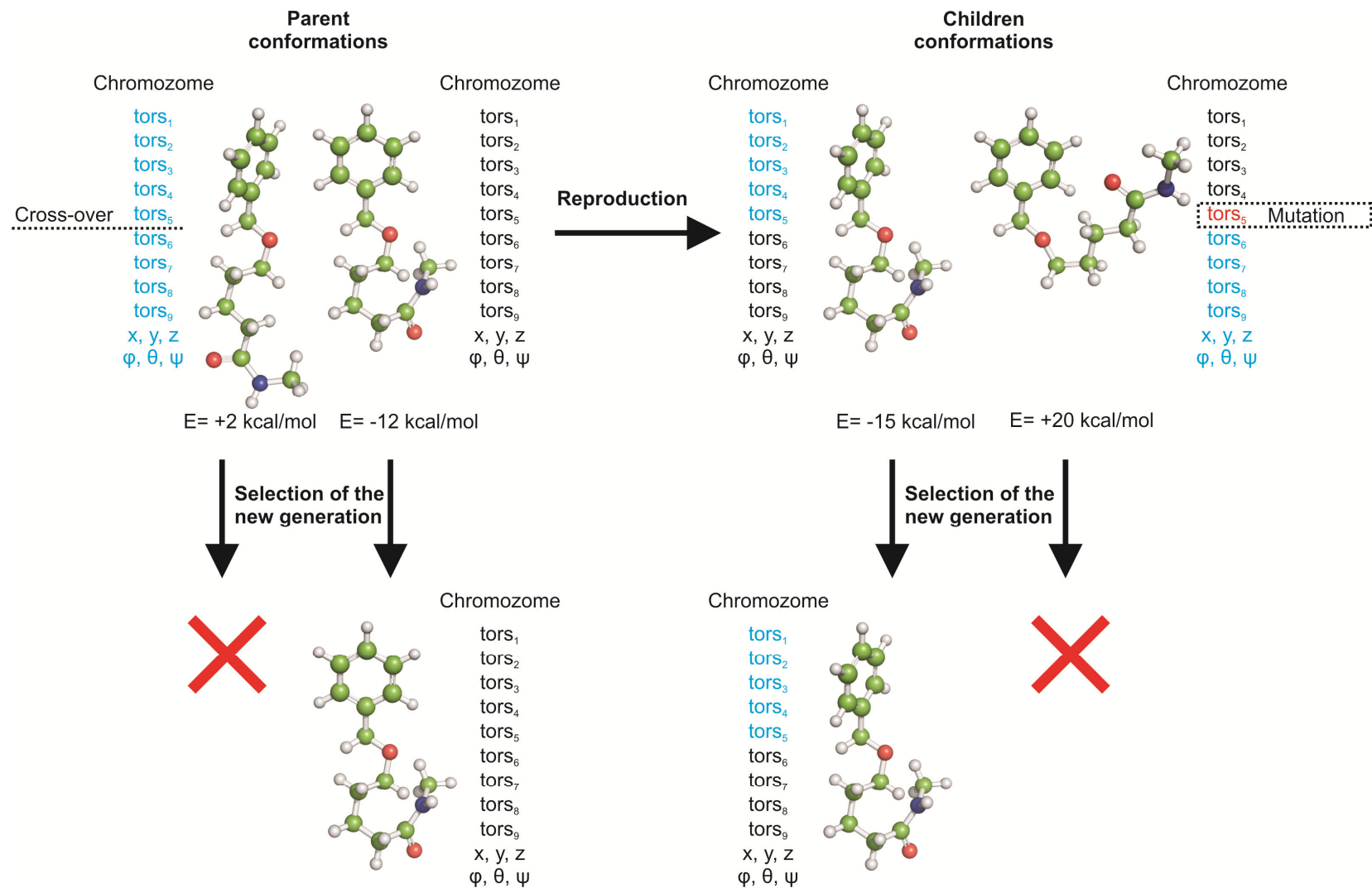
- vazebné módy všech ligandů z náhodně vytvořené počáteční populace jsou zakódovány v jejich „genech“, které jsou vystaveny náhodným genetickým modifikacím (crossover, mutace)
- jednotlivci (vazebné módy) s lepší životaschopností (odpovídá jejich vazebné energii) mají vyšší šanci přežít a reprodukovat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

□ nástroje

- AutoDock , GOLD ...



Stochastické energetické postupy



Molekulární dokování - hodnocení



□ hodnotící funkce

- hodnocení různých vazebných módů získaných prohledáváním
- výpočetně **efektivní** a poskytující **přesný** popis interakcí

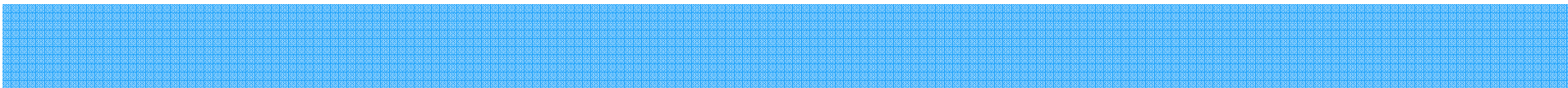
□ využití hodnotících funkcí k řazení

- **několika vazebných módů jednoho ligandu v rámci jednoho receptoru** – důležité pro výběr módu blízkého experimentálnímu
- **několika různých ligandů navázaných do jednoho receptoru** – stanovení specifiity substártů či inhibitorů
- **jednoho ligandu navázaného do více různých receptorů** – studium selektivity léčiv (vedlejší účinky)

Molekulární dokování - hodnocení



- **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**



Molekulární dokování - hodnocení

□ kategorie hodnotících funkcí

▪ empirické

- odvozeny fitem následující rovnice 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

Molekulární dokování - hodnocení

□ kategorie hodnotících funkcí

▪ znalostní

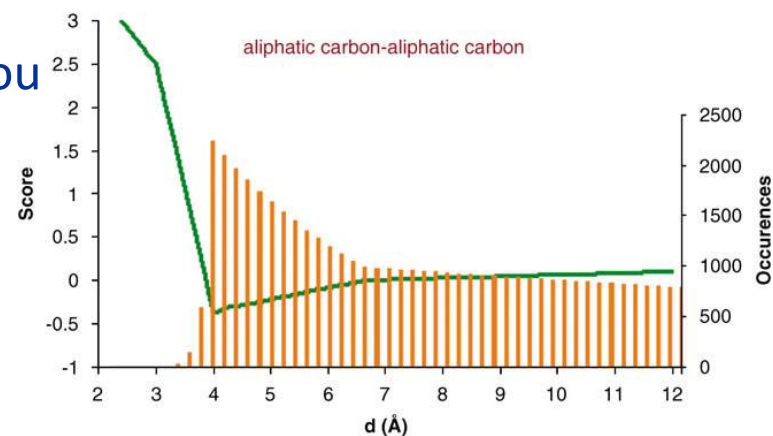
- pomocí **statistické analýzy** využívá **znalost** vazby ligandů v proteinech, která je implicitně uložena ve **strukturních datech**

- párové atomové potencionály jsou odvozeny ze vzdáleností těchto párů ve strukturních databázích

- **rychlé vyhodnocení**

- popisuje **všechny typy interakcí** bez potřeby jejich výběru

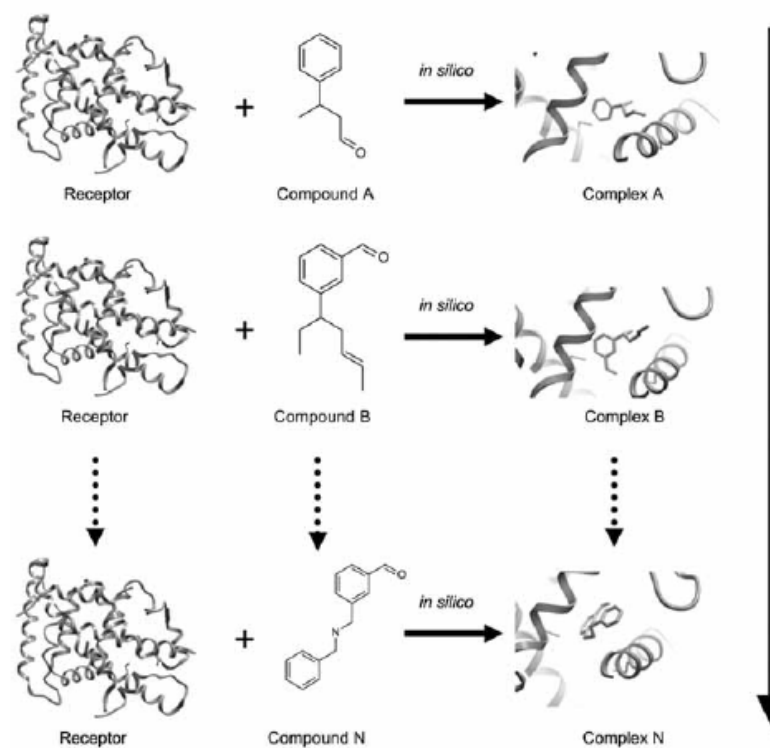
- **problém** nastává pouze pokud **strukturní data nemají dostatek informace** o daném páru atomů (e.g. halogenidy, kovy, ...)



Virtuální screening

□ masivní molekulové dokování

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



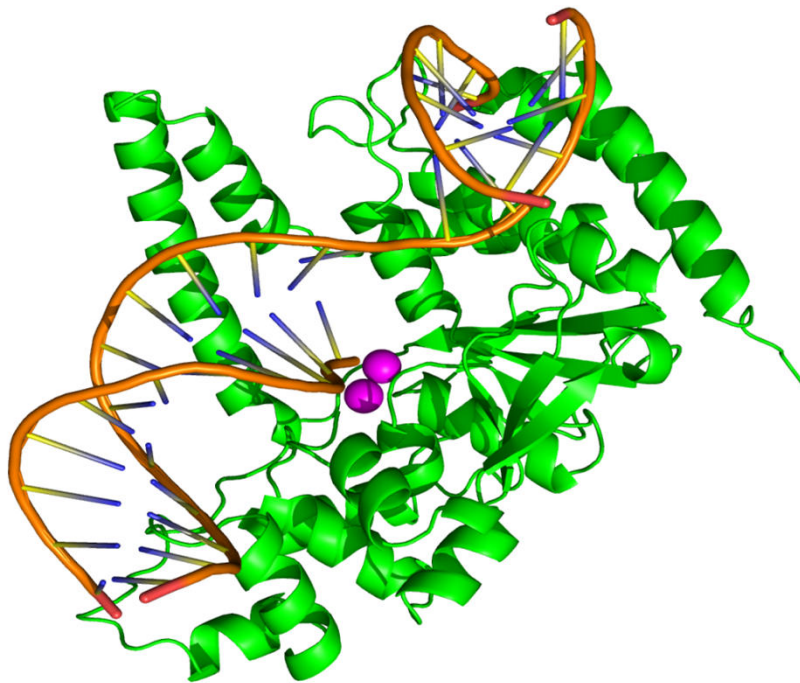
Osnova

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

Inhibitory endonukleasy MUS81

□ **proteinový cíl**

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



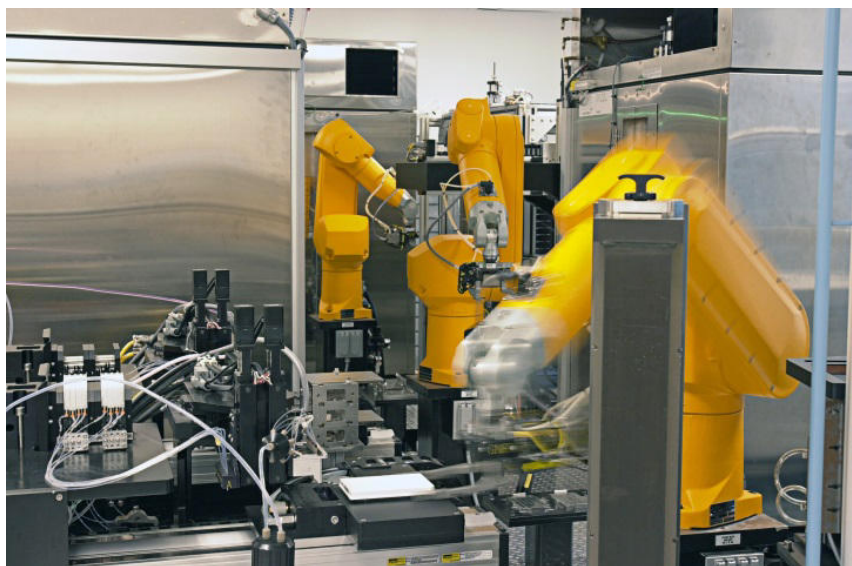
Inhibitory endonukleazy MUS81

□ HTS

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

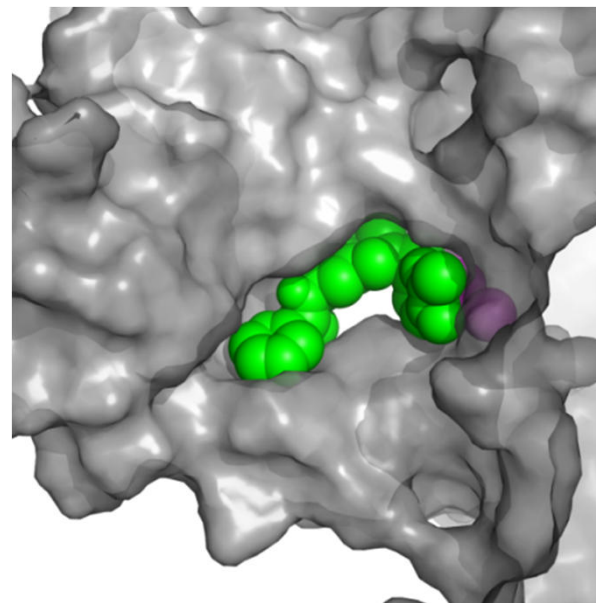
□ výstup

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



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 endonukleazy MUS81

☐ závěr

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

Shrnutí

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