

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy
v biomedicínálním výzkumu
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0184

Cvičení – Farmakofor

V tomto cvičení si ukážeme, jak provádět hledání farmakoforu. Pokusíme se najít farmakofory pro serotoninový receptor.

Budeme opět pracovat v MOE 2009.10 - <http://www.chemcomp.com/journal/ph4.htm>

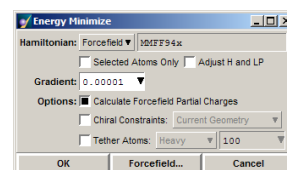
Příprava dat – příprava konformací

K provedení hledání farmakoforů je zapotřebí databáze konformací pro látky, pro něž jsou známy IC₅₀. My využijeme databáze s látkami dle Daveu, C. et al. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* 39 (1999) 362–369. Tato databáze je již součástí MOE: `$MOE/sample/mol/serotonin.mdb`. Tato databáze obsahuje 25 molekul pro reprezentaci aktivního setu a 250 náhodných neaktivních tzv. decoy molekul. Naším cílem je vytvořit takový farmakoforický dotaz, abychom našli pokud možno co nejvíce aktivních molekul a co nejméně těch neaktivních.

- 1) Nejdřív si otevřete zvolenou databázi (**MOE>File>Open>sample/mol/serotonin.mdb**)
- 2) Do struktur je třeba je zapotřebí doplnit vodíky (**Database viewer(DBV)> Molecule> Wash**). Volba je **Hydrogens>Add Explicit Hydrogens**.
- 3) Následně si musíme spočítat dostupné **konformace** (**Database viewer(DBV) > Molecule > Conformational Search**, ev. **MOE>Compute>Conformations> Conformational Search**). Vytvoříte si tím novou databázi konformerů. Nicméně, počítat to pro celou databázi všech látek by bylo příliš zdlouhavé, proto si to zkuste pouze pro jednu molekulu (z okna MOE). Použijte max. konformační energii (**Strain**) 4 kcal/mol a limit na 250 konformací (**Conformation Limit**).
- 4) Předpočítanou databázi konformací pak najdete na `$MOE/sample/mol/serotonin_conf.mdb`. Uložte si ji jinam. Do této databáze nicméně musíme přidat hodnoty $-\log IC_{50}$. V `serotonin_conf.mdb` (**DBV > Compute > Molecule > Molecule Name>Extract from Molecule**) – doplnit do Output Field `mol_name`. (**DBV > File > Merge**) přidat databázi kde jsou hodnoty pro pole $-\log IC_{50}$ uloženy. Jako klíč (**key1**) pro obě databáze použijte `mol_name`. Po spojení již budete mít vhodnou databázi.

Příprava farmakoforického dotazu

- 1) Výběr referenční molekuly. Otevřete si databázi s $-\log IC_{50}$ (**File > Open > \$MOE/sample/mol/serotonin.mdb**). Vyberte si v DBV neaktivnější (největší pIC₅₀) molekulu jako referenční a zobrazte si ji (**DBV > Molecule Popup (pravé tlačítko) > Send to MOE** ev. dvojklikem na molekulu v DBV). Molekulu zminimalizujte (**MOE>Compute> Energy Minimize**). Můžete si schovat vodíky (**MOE>Render>Hide>Hydrogens**)

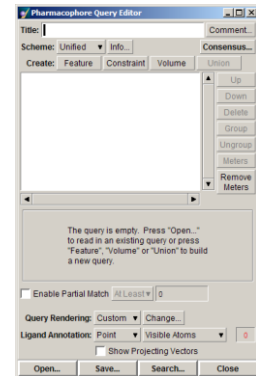


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy
v biomedicínálním výzkumu
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0184

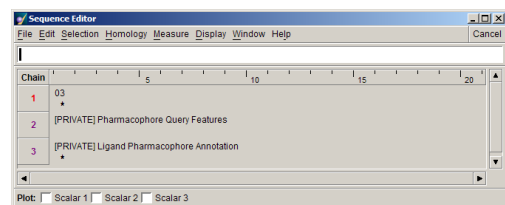
- 2) Připravte okno farmakofor (MOE > File > New > Pharmacophore Query), objeví se nové okno Pharmacophore Query Editor (PQE) – pojmenujte si ho např. Serotonin Agonist.

Dále se objeví spousta barevných anotačních bodů kolem molekuly ligandu (zelené – hydrofobní, fialové - donor vodíkové vazby a světle modré pak akceptor vodíkové vazby, atd.).



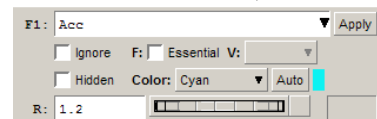
Jejich popis změníte (PQE>Ligand Annotation>Long) Jaké typy jsou k dispozici, zjistíte kliknutím na **Info** u farmakoforického schématu Unified. Schovete **Don2**, **Acc2** a **PiN** a můžete si toto nastavení uložit pomocí volby PQE>Info>Memory: **Basic**.

- 3) Otevřete editor sekvence (MOE > Window > Sequence Editor(SE)). Zobrazte si název látek v sekvenci (SE > Display > Compound Name). Posléze zde uvidíte, které body budou tvořit farmakoforický dotaz. Ujistěte se, že volba (SE>Display>Single Letter Residues) je vypnutá. Připravované vybírané farmakoforické vlastnosti se posléze objeví jako **Fn** a **Vn**.

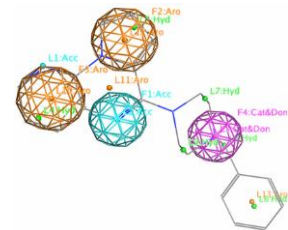


[PRIVATE] Pharmacophore Query Features
F1 F2 F3 F4 V1

- 4) Vybíráním bodů v hlavním okně budeme vytvářet farmakoforický dotaz. Vyberte **L2:Acc** na dusíku v prostředním kruhu. Potom klikněte na přidání vlastnosti (PQE>Feature). Všimněte si vzniklého zobrazení v hlavním okně MOE, kde se zobrazí jako koule vycentrovaná na dusíkovém atomu. V SE se objeví jako vlastnost **F1**. PQE zobrazí **F1:Acc** a zobrazí se její editovatelné vlastnosti.



- 5) Změňte toleranční poloměr na 1.2 angstromů. Povšimněte si, že se okamžitě změní i velikost koule na dusíku v hlavním okně MOE.
- 6) Dál vyberte bazický dusík na piperazinovém kruhu ring ("[NH1]1CCNCC1"), L3:Cat&Don. V PQE vyberte vzniklé **F2** a opět zvětšete jeho toleranční poloměr na 1.2 angstromů.
- 7) Zvolte **F3** jako střed aromatického jádra (L10) na pyridinovém kruhu ("c1ncccc1"). A jako **F4** aromatické jádro (L12) v pyrrolovém kruhu ("n1cccc1") a zvětšete jejich poloměr na 1.4 angstromu.
- 8) Uložte si query jako serotonin1.ph4 v (SQE>Save).





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

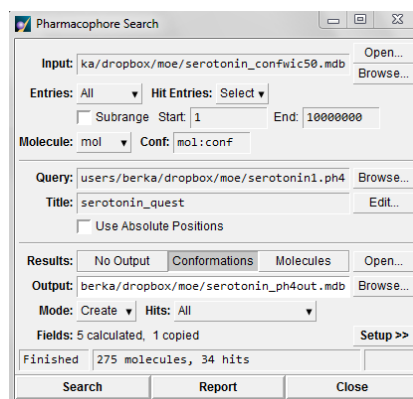


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy
v biomedicínálním výzkumu
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0184

Provedení farmakoforického hledání

- Otevřete panel hledání farmakoforů v databázovém okně (DBV>Compute> Pharmacophore> Search> serotonin_conf.mdb). Entries kontroluje, které látky se použijí k vyhledávání. Změňte Hit Entries>Select, abyste označili, které látky jsou farmakoforem označeny za aktivní.
- Výstupní databáze bude ph4out.mdb. Query bude připravený serotonin1.ph4. V menu Setup >> vyberte všechny výstupy a vyberte -logIC50 pro Copied Fields. Vraťte se zpět pomocí tlačítka << Back. Měla by se objevit věta: Fields: 5 calculated, 1 copied.
- Začněte vyhledávat pomocí Search.
- Poté co je hledání hotovo, objeví se Finished v Search status v levém dolním rohu společně s počtem nalezených látek. Finished | 275 molecules, 39 hits



Analýza výstupu

Je otázka, jak dobře model rozlišuje mezi aktivními a neaktivními látkami.

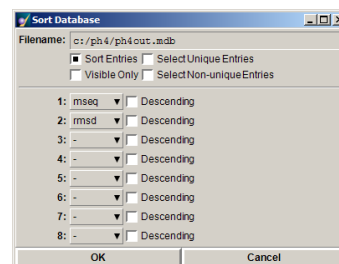
```

QUERY:
Title: Serotonin Agonist Query
Features: 4, Constraints: 0, Volumes: 0
Minimum Match Size: 4

TIME: 1.387 sec
molecules: 275          5.044 msec/mol          198.270 mol/sec
conformations: 6067    0.274 msec/conf          3653.208 conf/sec
hit molecules: 39      35.564 msec/hit          28.118 hit/sec
hit conformations: 1139 1.219 msec/hit          820.476 hit/sec
all hits: 1152         1.204 msec/hit          830.570 hit/sec

```

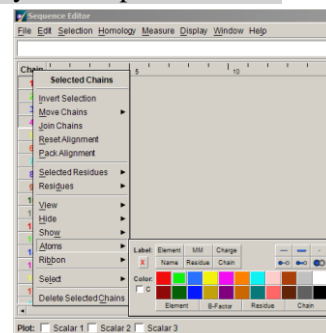
- V řádku Pharmacophore Search|Status Line najdete počet hitů – nalezených látek.
- Pomocí tlačítka Report si otevřete zprávu.
- Otevřete si databázi s výsledky Results>Open>ph4out.mdb. Měla by obsahovat 39 molekul (mseq) s asi 1 100 řádky označujícími jednotlivé konformace.
- Rozřaďte si databázi tak, aby nejlépe pasující konformer byl vypsán jako první. DBV>Compute>Sort>OK (1. mseq a 2. rmsd).
- Dále se budeme zajímat jen o konformery s nejmenším RMSD: DBV>Compute>Sort>Sort Entries(off)+ Select Unique Entries(on) +Priority1(mseq) >OK a pak ukryt nevybrané konformery: DBV>Display>Entry>Hide Unselected Entries.
- Tyto vybrané výsledky uložte v samostatné databázi s volbou Selected Entries Only: DBV>File>Save As>result.mdb.
- Můžete si spočítat obohacení (enrichment) tím, že si projdete, které aktivní a neaktivní látky byly vybrány:
 $R = (24 \text{ aktivních} (+1 \text{ použitá na tvorbu farmakoforu}) / 38) / (24 / 274) = 7.2$.
- Zobrazte si dotaz hledání MOE> Pharmacophore Search>Edit a nalezené hity: DBV>File>Browse>result.mdb. Posuňte si posunovník Entry a nahrajte si postupně nalezené hity pomocí tlačítka ▶.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

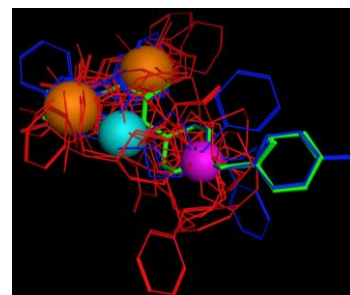
Inovace vzdělávání v chemii a biologii s ohledem na aktuální trendy
v biomedicinálním výzkumu
reg. č.: CZ.1.07/2.2.00/28.0184

- 9) Alternativně můžete zobrazit všechny hity najednou: **Pharmacophore Editor> Ligand Annotation(none)**. Změňte zobrazení vlastností na **Sphere: Solid, Density: High a Text: None**. Vyberte si všech 39 vstupů a použijte: **DBV>Molecule Popup>Send Selected To MOE**.
- 10) V **Sequence Editor** můžete zobrazit jméno sloučeniny: **SE> Display> Compound Name** a najít si tak dodatečné popisy (**Pharmacophore Query Features** a **Ligand Pharmacophore Annotation**) a přesuňte je do pozadí **SE>Chain Popup> Move Chain> Bottom**.
- 11) První 4 řetězce teď obsahují pouze vysoce aktivní molekuly (03,02,05,16) s $-\log IC_{50}$ nad 9. Následujících 21 řetězců obsahuje slaběji aktivní molekuly s $-\log IC_{50}$ mezi 6 a 8. Zbývající řetězce ukazují dodatečné „šumné“ (decoy) molekuly (**BAS xxx**) s $-\log IC_{50} = 0$.



- 12) Označte si atomy pouze vsoce aktivních molekul – vyberte si první 4 molekuly a **SE>Selected Chains Popup>Atoms** a označte si je zeleně. Podobně si označte slabě aktivní látky modře a neaktivní červeně.

Můžete si všimnout, že zatímco zelené jsou si všechny velmi podobné; červené okupují i prostory, ve kterých se modré ani zelené atomy nevyskytují, což může být způsobeno tím, že v dotýčných místech by se vyskytovaly aminokyseliny receptoru. V následujícím cvičení si upravíme farmakofor tak, abychom na tento fakt brali ohled.



Úprava vyhledávacího dotazu

Dotaz lze upravovat například upravou tolerance vůči jednotlivým vlastnostem, přidáváním omezení na vzdálenosti, nebo na objem a umožněním pouze částečné shody. Přidáním vyloučeného objemu je možné redukovat tak, abychom vzali v potaz možný tvar kavity v receptoru. V tomto případě toho využijeme při úpravě dotazu, abychom omezili množství nalezených neaktivních molekul.

- 1) Všimněte si, že červené neaktivní molekul častokrát přesahují prostor aktivních molekul, takže si je zkusíme vyloučit právě přidáním vyloučeného objemu do vyhledávání. Označte si tento prostor tím, že označíte některé atomy v přesahujících červených fragmentech.
- 2) Nyní upravíme vyhledávací dotaz ze všech těchto kousků: **Pharmacophore Query Editor>Union**. To vytvoří sloučený objem kolem vybraných atomů. Označte jej za **Excluded**. Upravte si jeho objem tak, aby překryl všechny přesahující neaktivní látky, ale aby nezasahoval do aktivních molekul (např. 2.5 Å).
- 3) Uložte si nový farmakoforický dotaz (např. **serotonin2.ph4**).
- 4) Zkuste si znovu vyhledávání. **Pharmacophore Query Editor>Search**. Zkuste si spočítat, oč se Vám vylepšil enrichment faktor R.

Je samozřejmě možné ještě vylepšovat dotaz přidáváním dalších vlastností, přidáváním omezení a podobně. Taktéž je zajímavé porovnat látky mezi sebou a zkusit si srovnat struktury několika nejlepších látek pomocí funkce **Flexible Alignment**.