



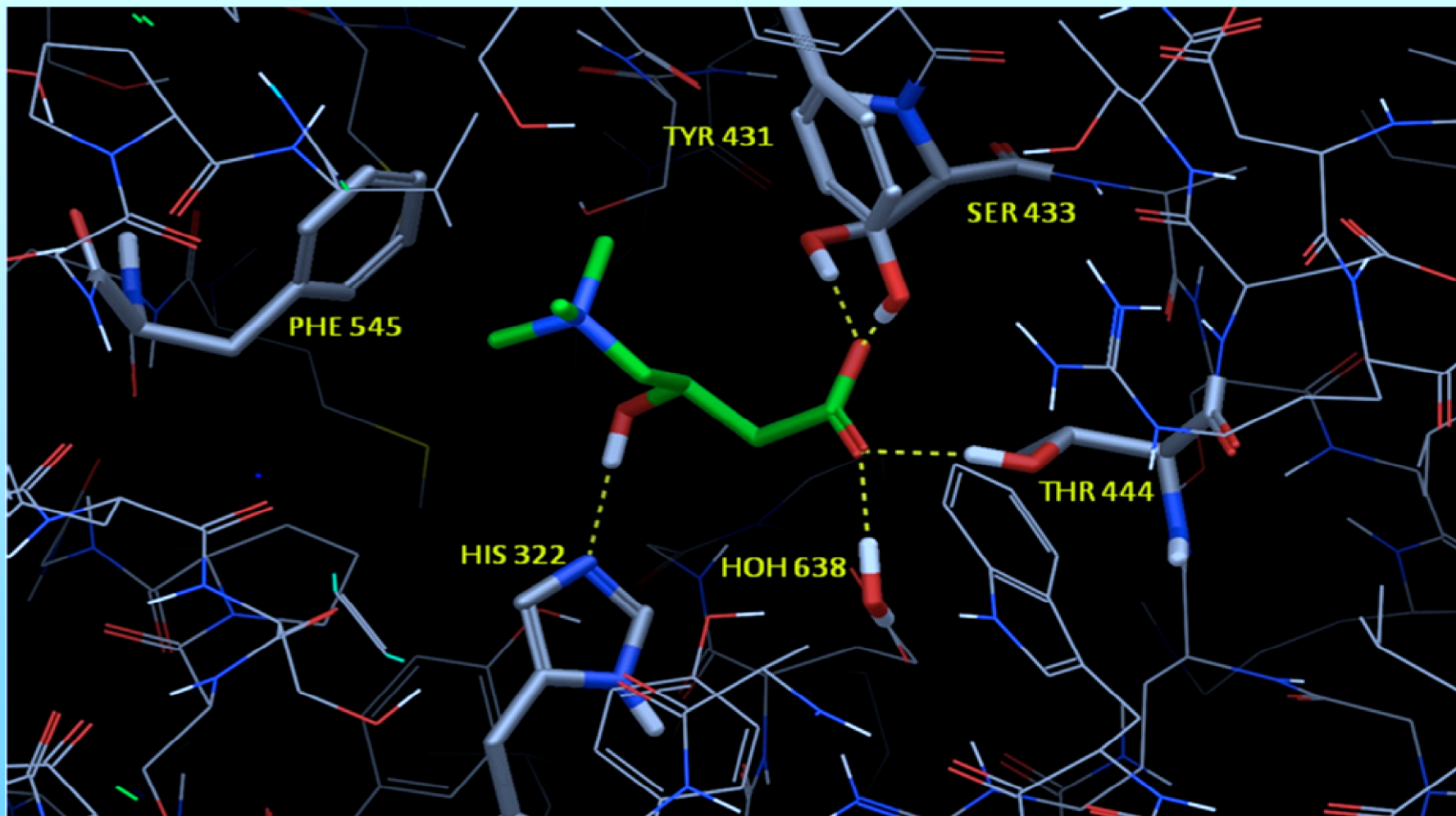
Mildronāta un tā analogu kompleksācijas pētījumi ar karnitīnacetiltransferāzi (CrAT) un γ - butirotetaīna hidroksilāzi (GBBH)

Dr.chem.hab. Edvards Liepiņš, M.Sc. Kristaps Jaudzems, M.Sc. Inguna Goba, B.sc. Kirils Zinovjevs, B.sc. Sergejs Katušenoks

- Ligandu kompleksācijas ar CrAT un GBBH kodolmagnētiskās rezonances (KMR) pētījumi, lai radītu jauna veida mildronāta analogu meklējumos izmantojamus saistības modeļus molekulārā līmenī
- Datubāzēs atrodamo savienojumu *in silico* skrīnings uz abiem enzīmiem principiāli jaunu inhibitoru struktūru ģenerēšanai



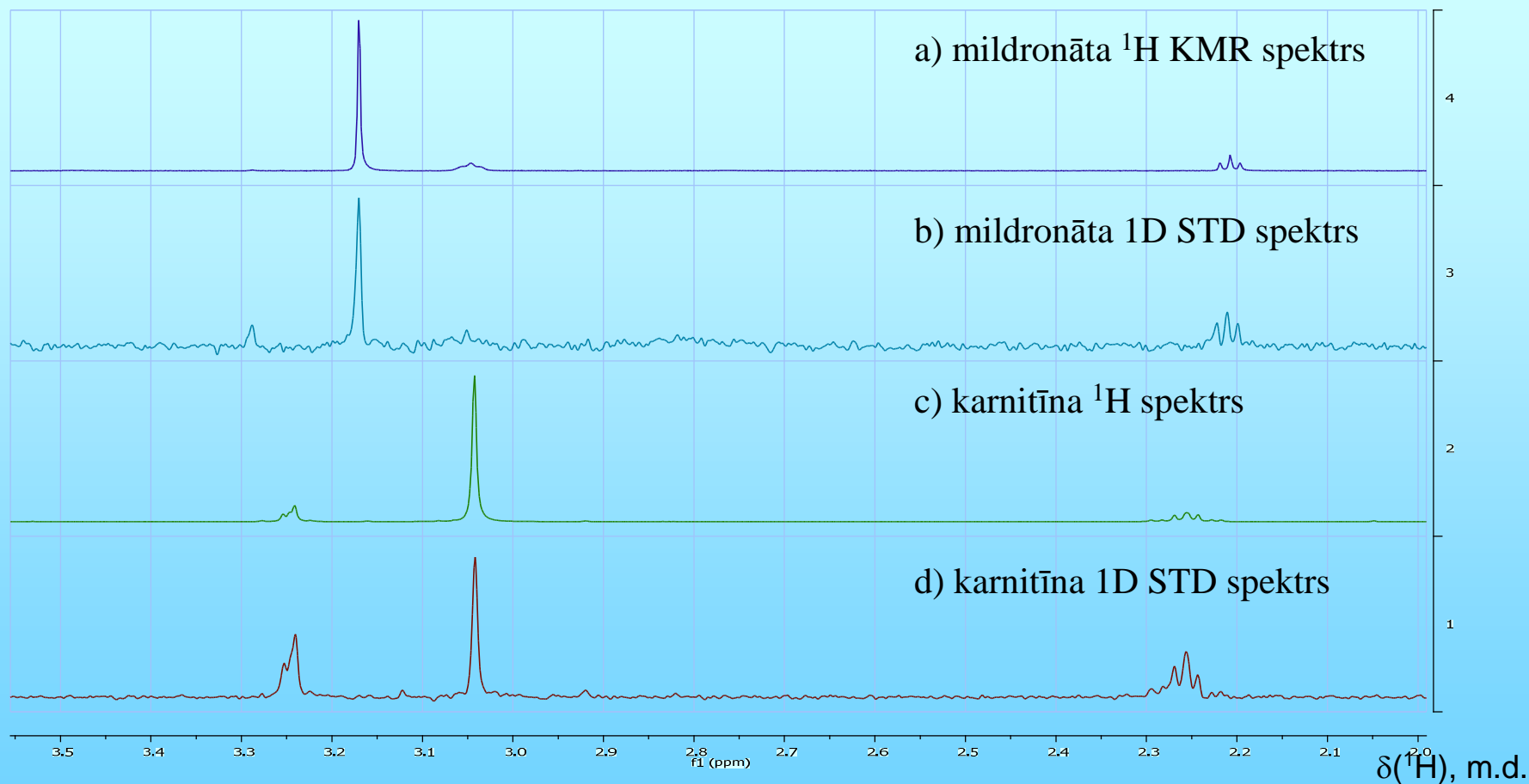
Karnitīna saistība CrAT aktīvajā centrā



Karnitīns saistās CrAT aktīvajā centrā ar 5 aminoskābēm (Tyr 431, Ser 433, His 322, Phe 545) un vienu ūdens molekulu (HOH 638)



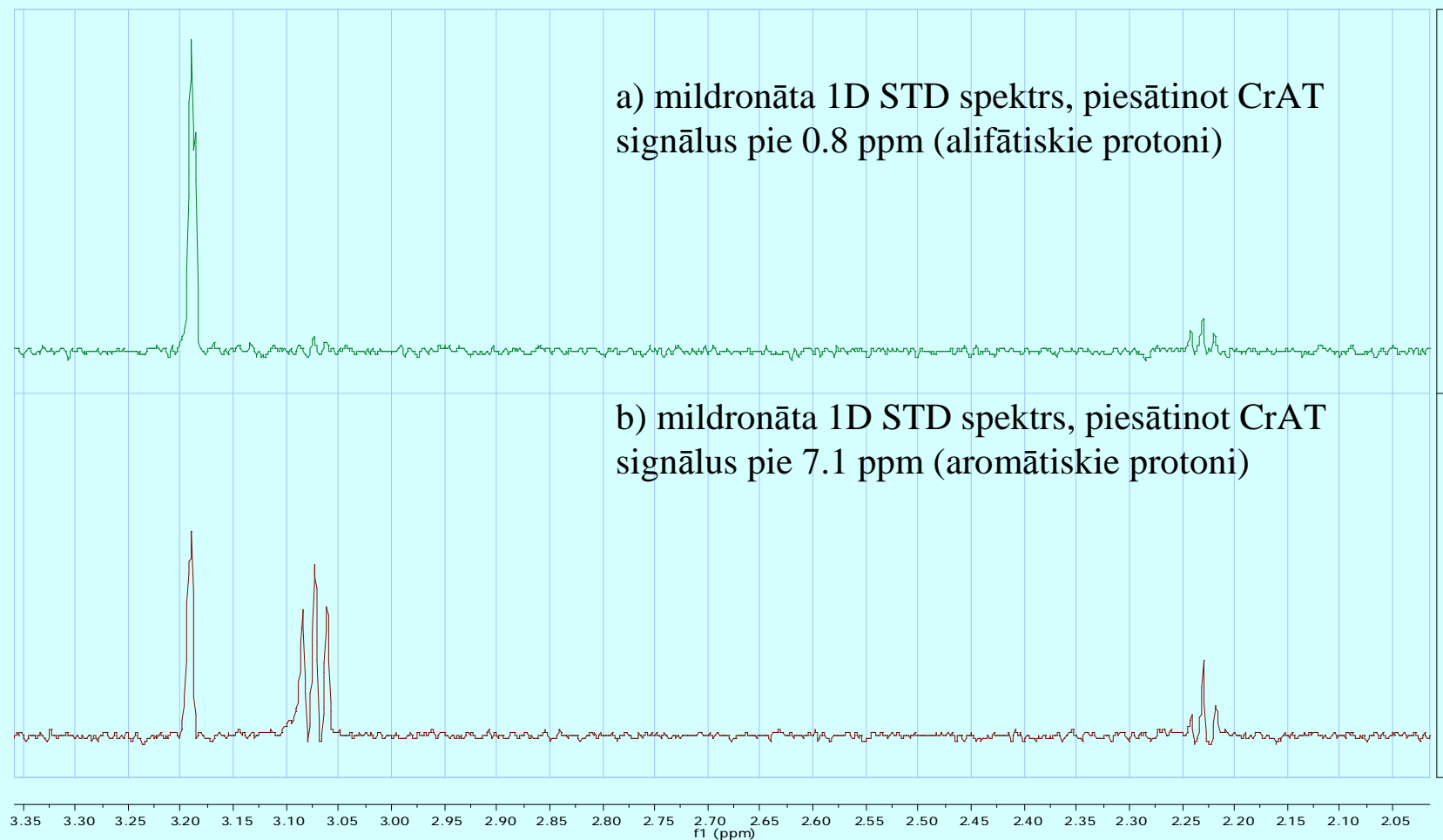
Mildronāta specifiskās saistīšanās pie CrAT raksturošanai izmanto konkurējošo ligandu piesātinājuma pārneses diferences (STD) metodi



Gan mildronātam, gan karnitīnam intensīvākie STD signāli attiecas uz metilēngrupām, kas atrodas blakus karboksilgrupai, bet trimetilamonija grupas STD signāls ir salīdzinoši vājš



Aptuvena mildronāta saistības partneru identifikācija, izmantojot dažādas selektīvās apstarošanas vietas CrAT molekulā



$\delta(^1\text{H})$, m.d.



Potenciālo CrAT inhibitoru meklējumi

Sākotnējā ligandu atlase:

- 1'130'975 ligandi no datu bāzes ZINC (<http://zinc.docking.org>)

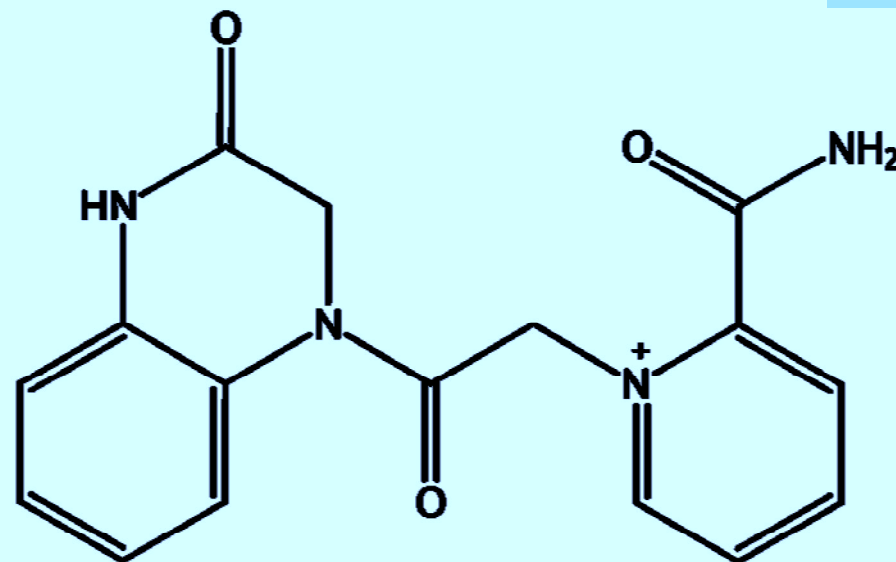
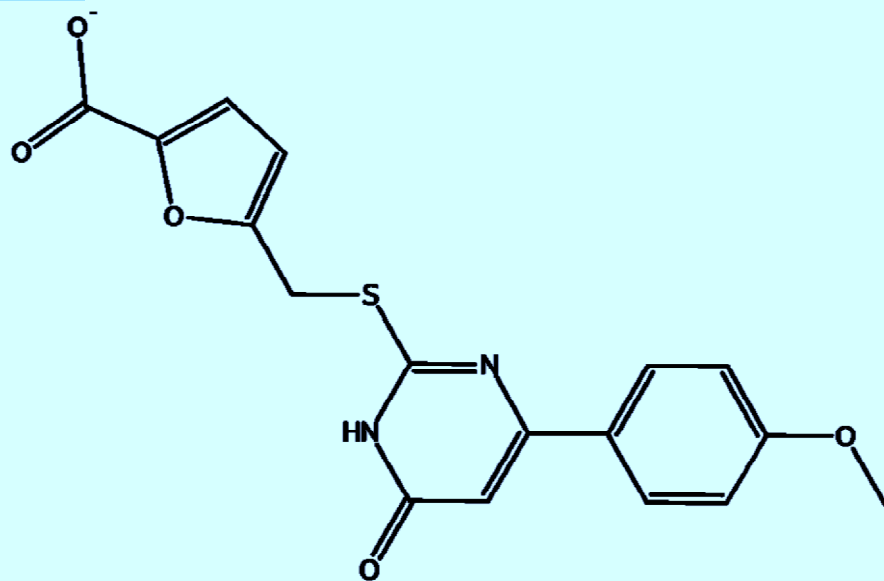
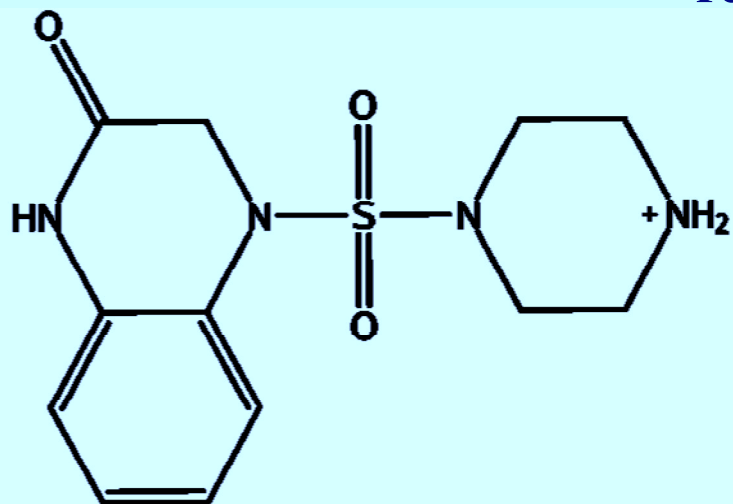
4 soļu virtuālais skrīnings:

- izmantojot HTVS dokingu atlasīti 10'000 ligandi;
- atlasītie ligandi, izmantojot SP dokinga algoritmu, „ievietoti” kristāla modelī un savienojumu skaits sašaurināts līdz 200;
- ar XP dokinga algoritmu, iegūst 40 labāko ligandu “komplektu”;
- 40 ligandu datubāze „ievietota” kristālā izmantojot inducētās pielāgošanās (IFD) algoritmu.

Aprēķinu rezultātā iegūti 737 liganda - proteīna kompleksi

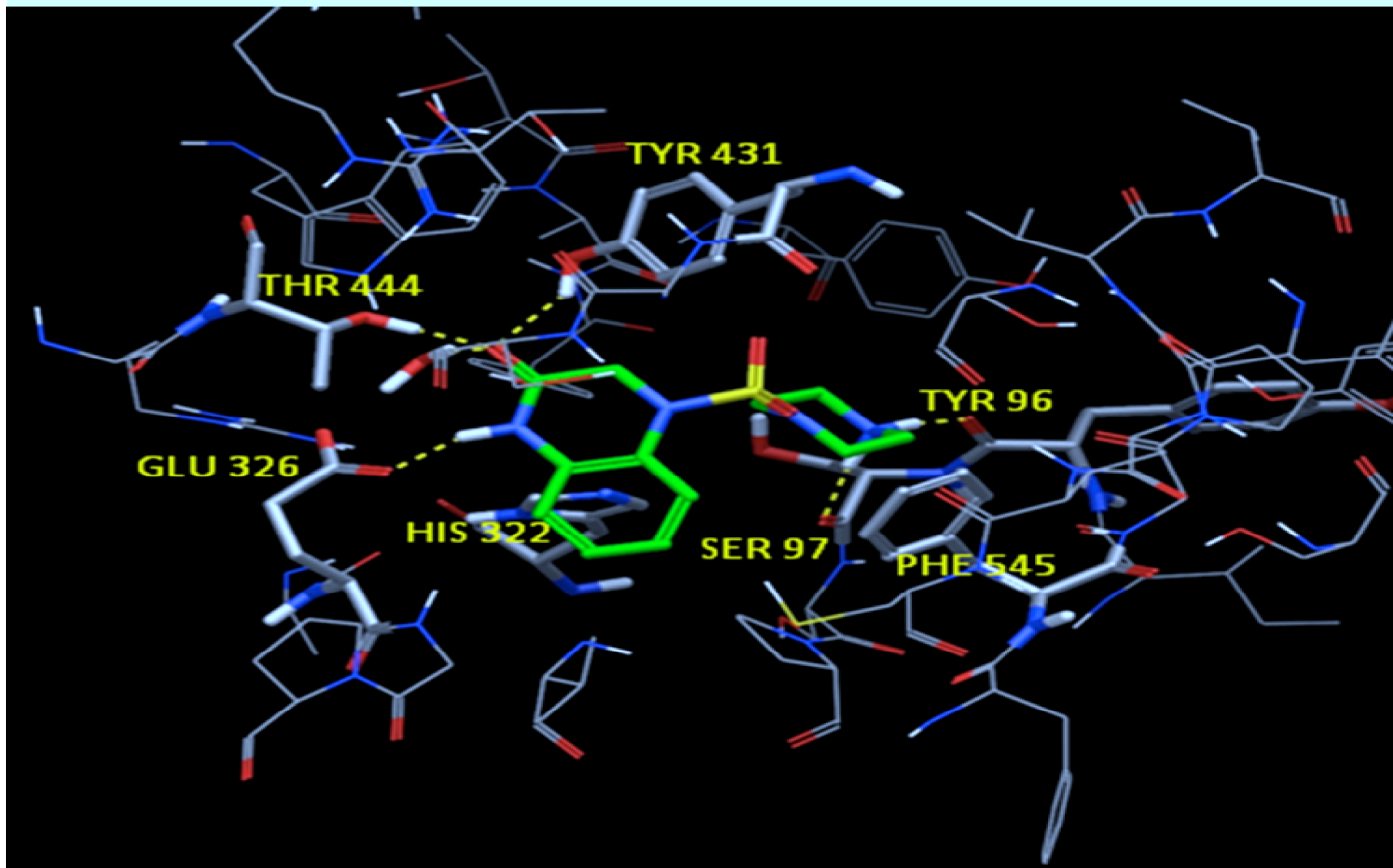


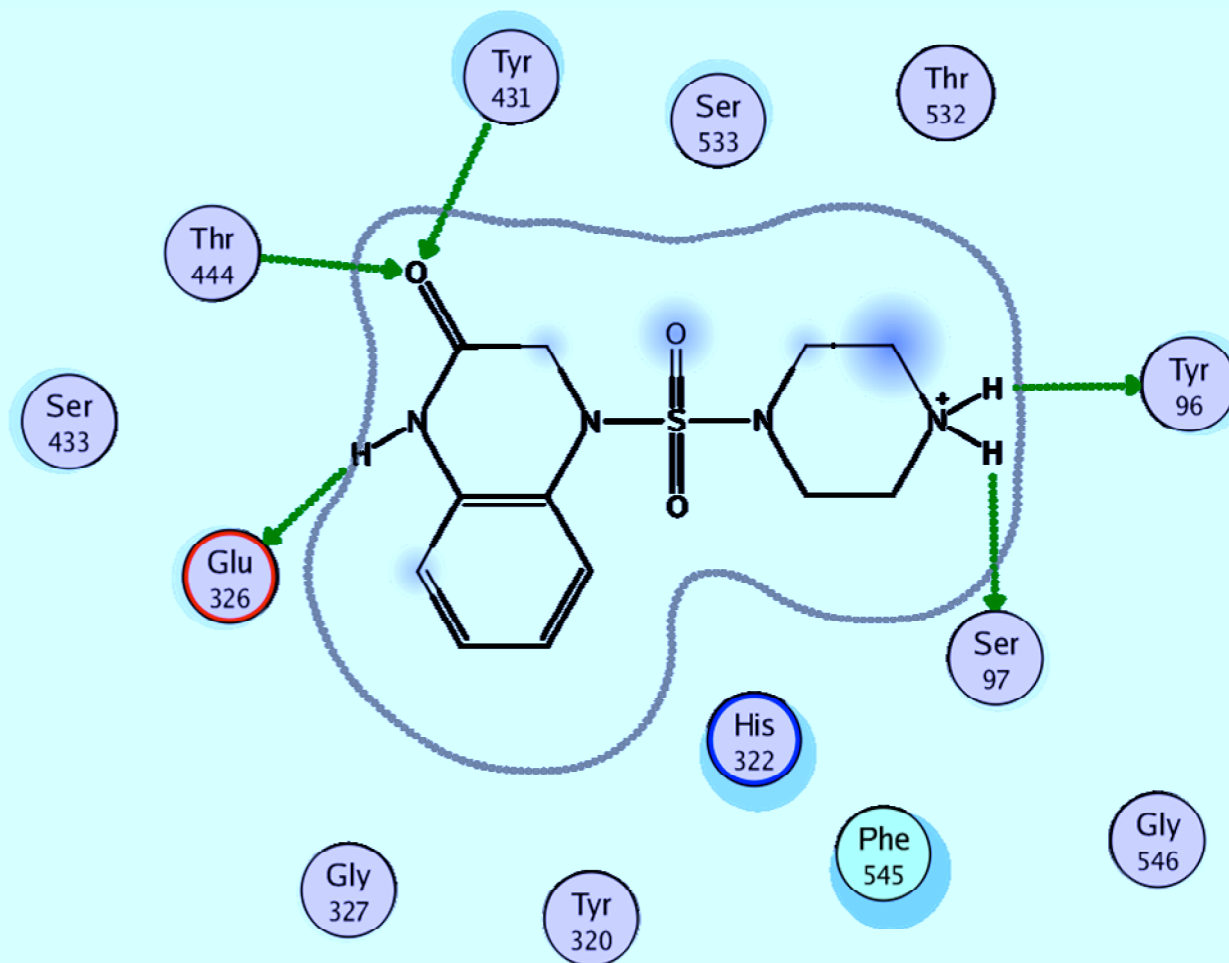
Labākie CrAT ligandi pēc inducētās pielāgošanās (IFD) dokinga rezultātiem





Liganda ZINC20293910 IFD ievietošanas rezultātu vizualizācija

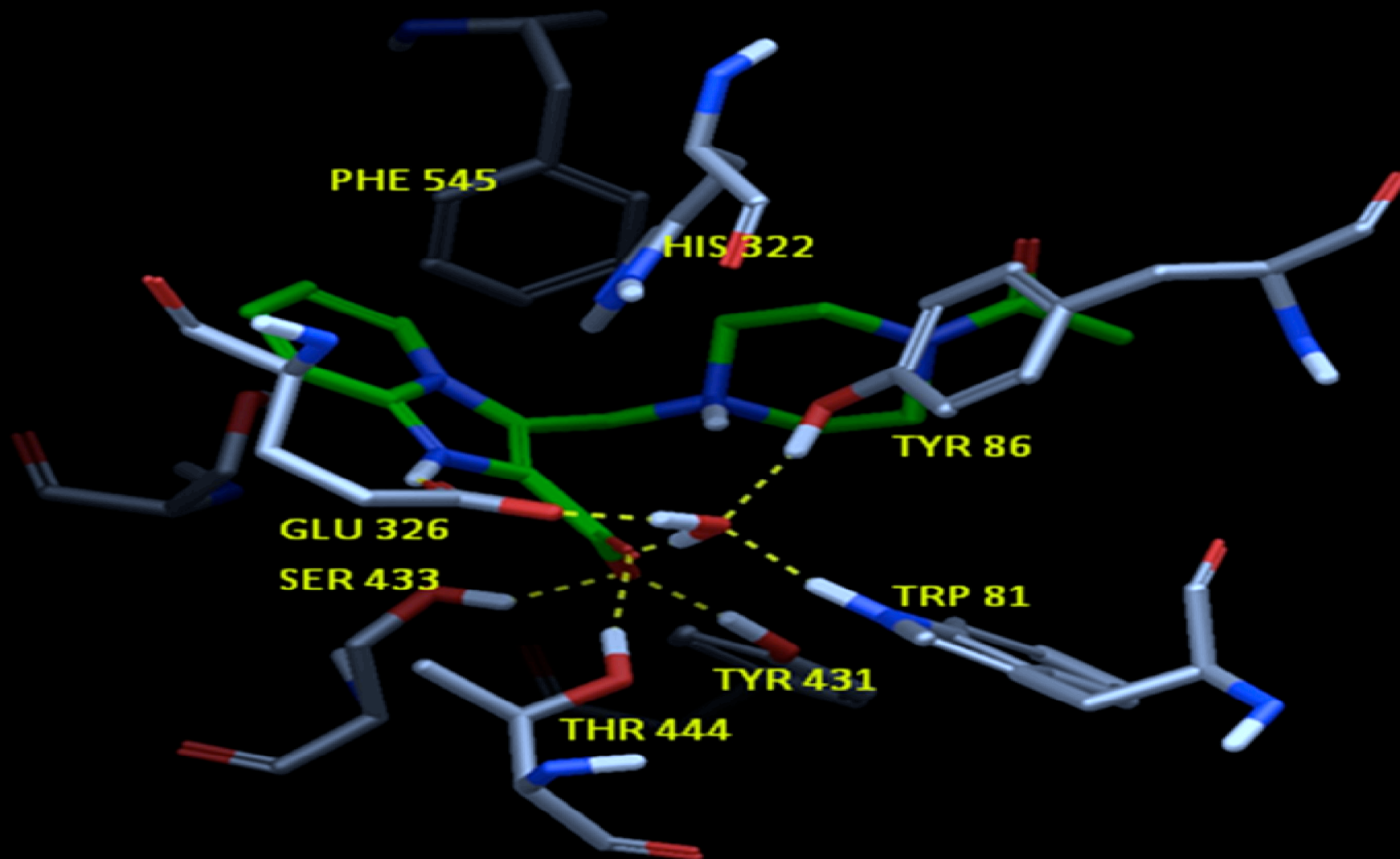


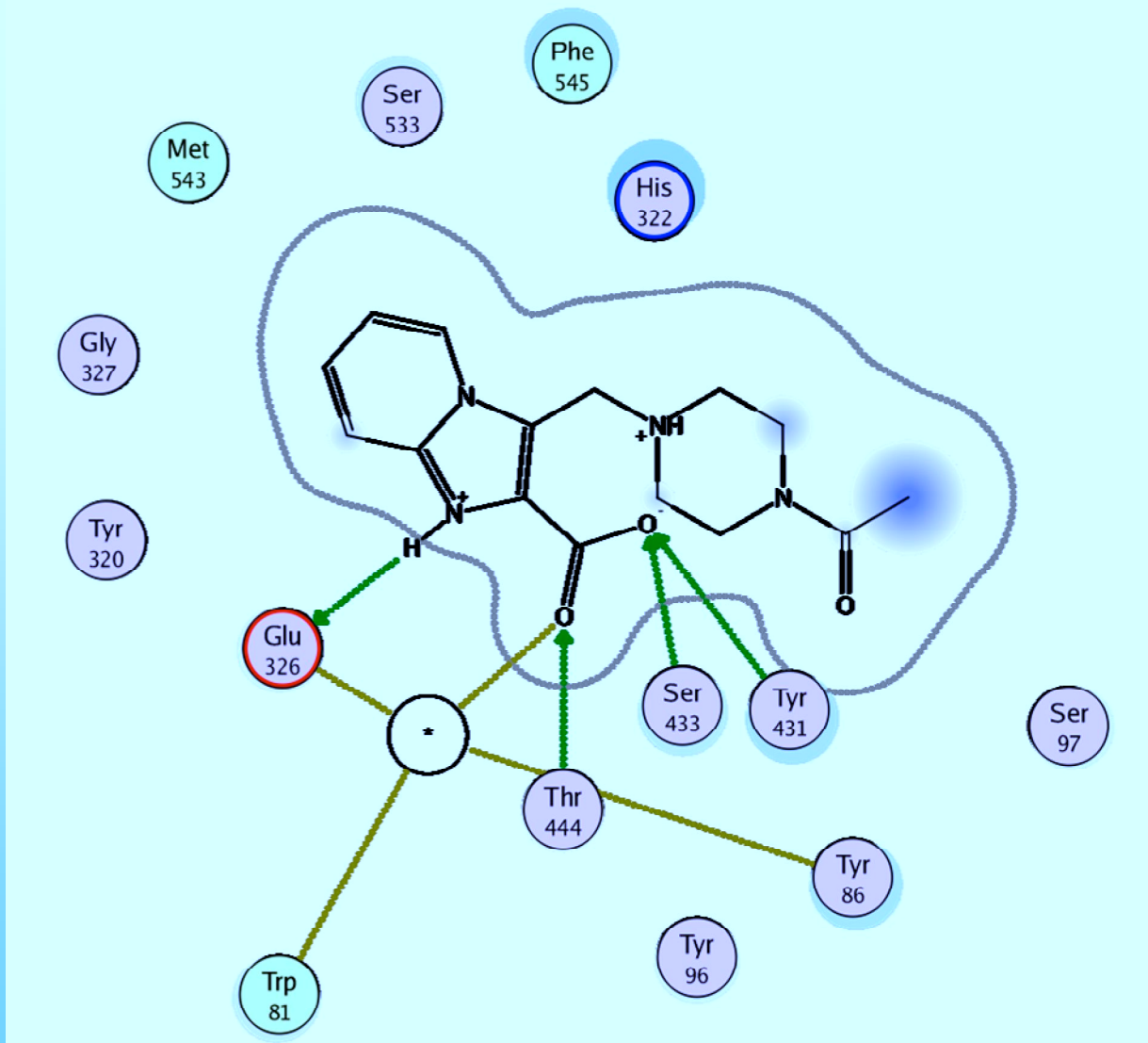


Labākais ligands (ZINC20293910), līdzīgi karnitīnam, saistās ar 4 aminoskābēm - TYR 431, THR 444, HIS 322, PHE 545, bet nesaistās ar ūdens molekulu un SER 433. Papildus saistība ar GLU 326, TYR 96 un SER 97 var to enerģētiski kompensēt, kas ļauj pieņemt, ka savienojums varētu būt CrAT inhibitors.



Liganda ZINC21660128 IFD ievietošanas rezultātu vizualizācija

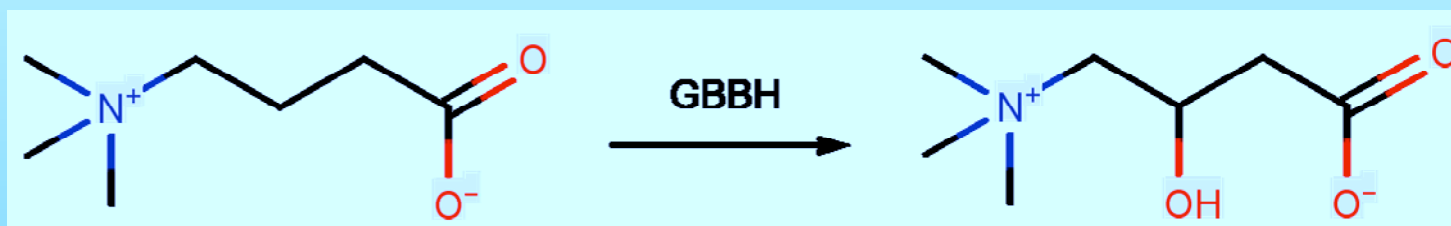




Ligands ZINC21660128 (3. labākais) saistās ar tām pašām aminoskābēm, kuras atbild par karnitīna saistību. Papildus ūdens molekula veido saites ar GLU 326, TRP 81 un TYR 86.

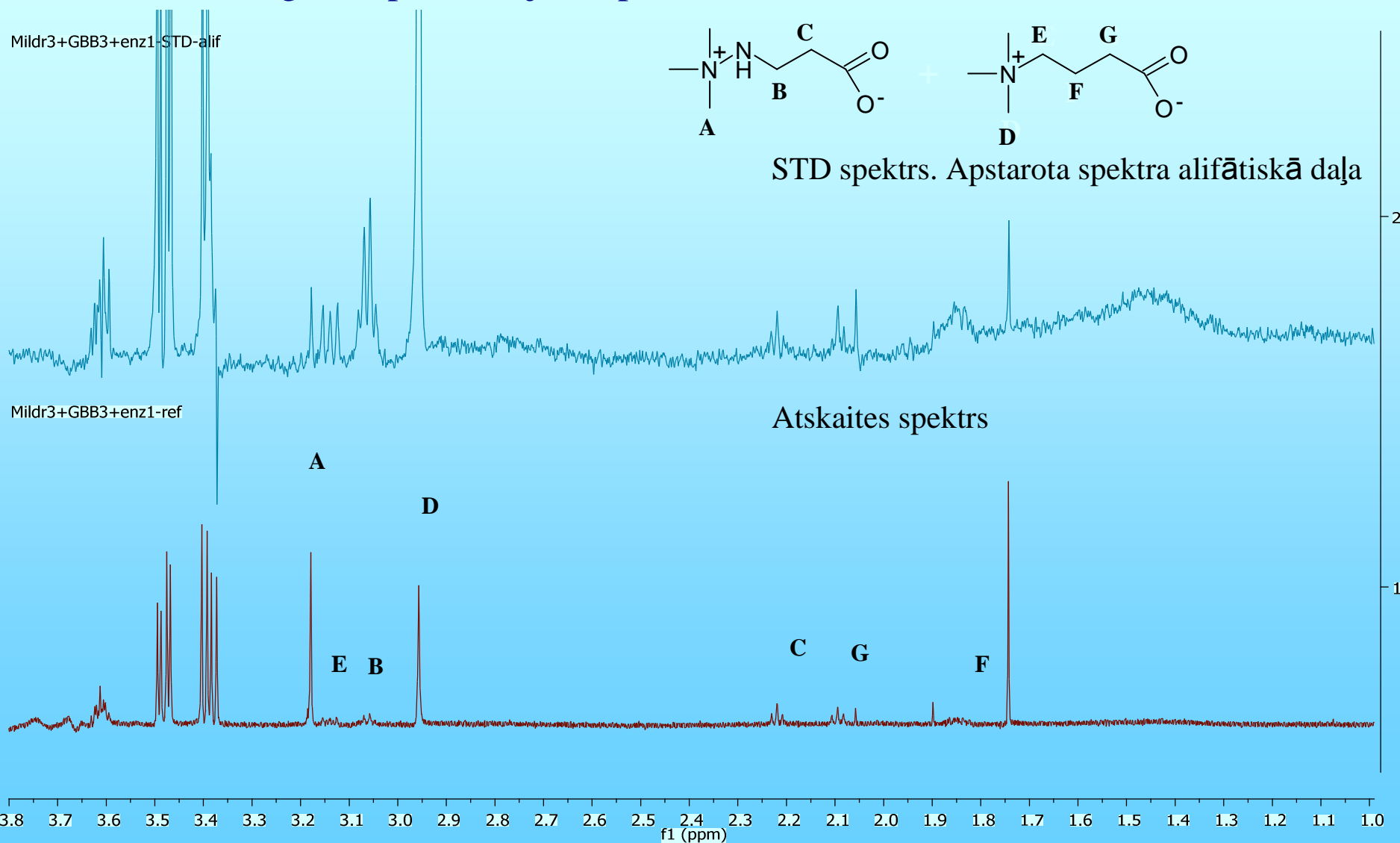


γ -Butiropetaīna hidroksilāzes (GBBH) un mildronāta kompleksa modelēšana





γ -Butirobetaīna un mildronāta maisījuma saistības pētījumi ar konkurējošo ligandu piesātinājuma pārneses diferences (STD) metodi

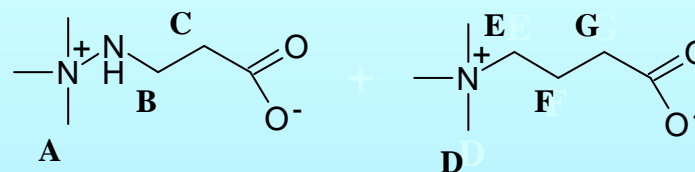
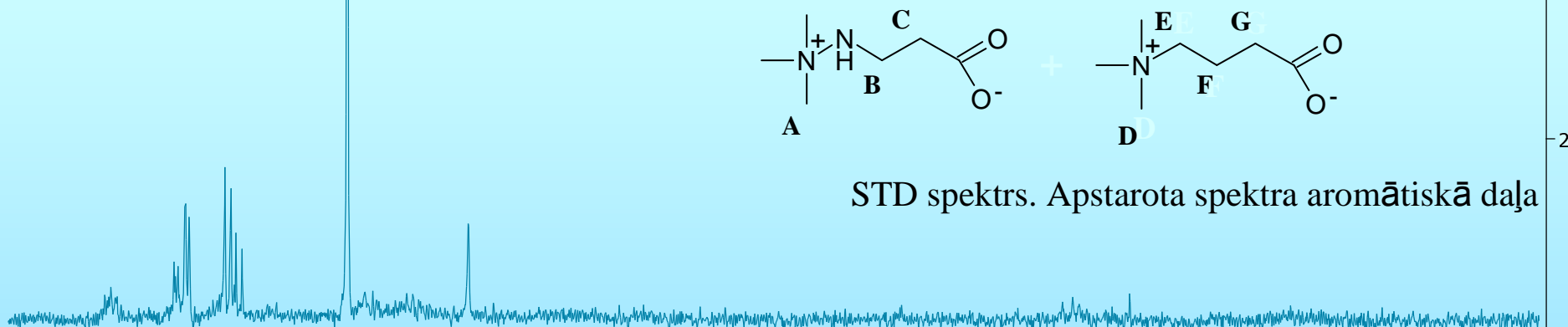


f1 (ppm)



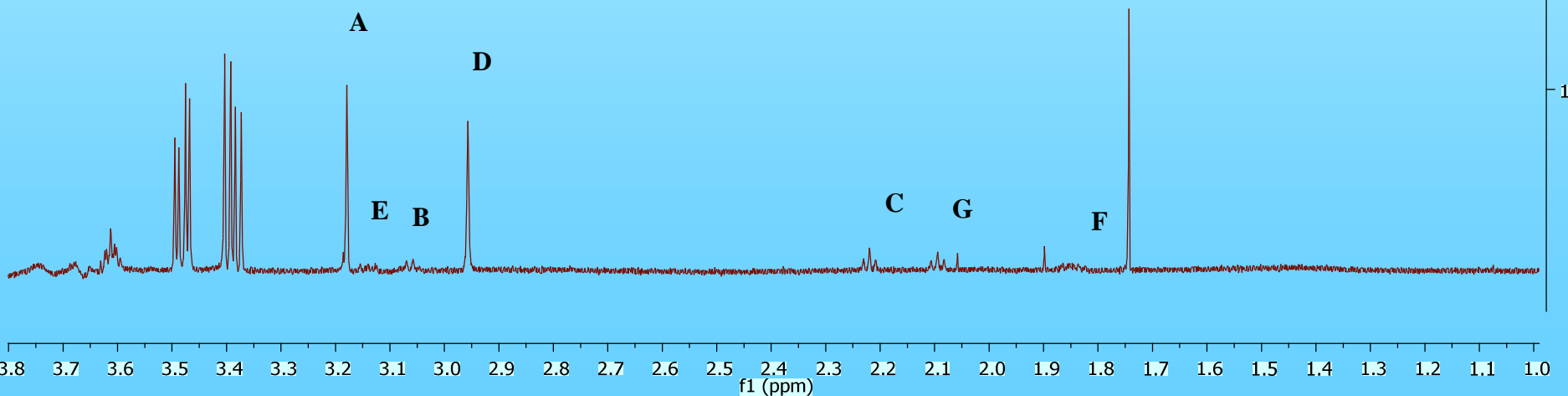
γ -Butirobetaīna un mildronāta maisījuma saistības pētījumi ar konkurējošo ligandu piesātinājuma pārneses diferences (STD) metodi

Mildr3+GBB3+enz1-STD-arom



STD spektrs. Apstarota spektra aromātiskā daļa

Mildr3+GBB3+enz1-ref

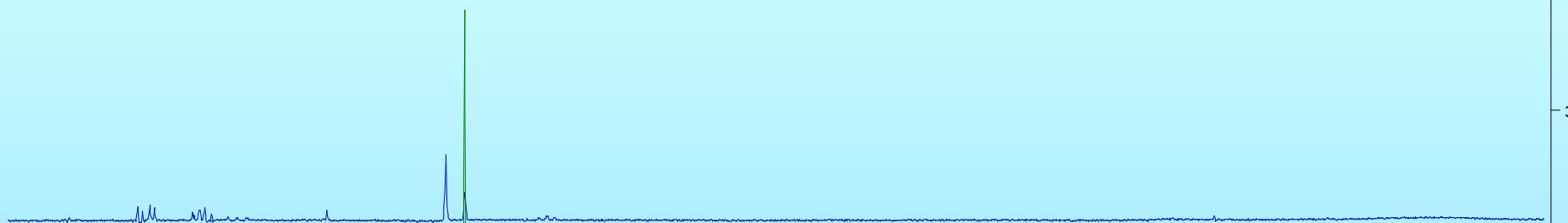


Atskaites spektrs



Divu GBB analoģu (savienojumi A un B) saistības salīdzinājums ar konkurējošo ligandu piesātinājuma pārneses diferences (STD) metodi

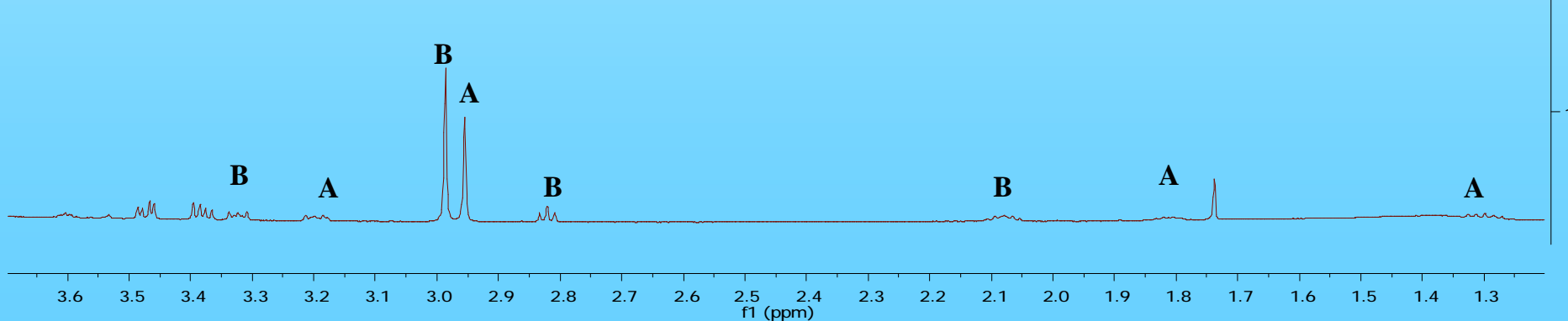
SPvielas+enz-STD-arom



SPvielas+enz-STD-alif



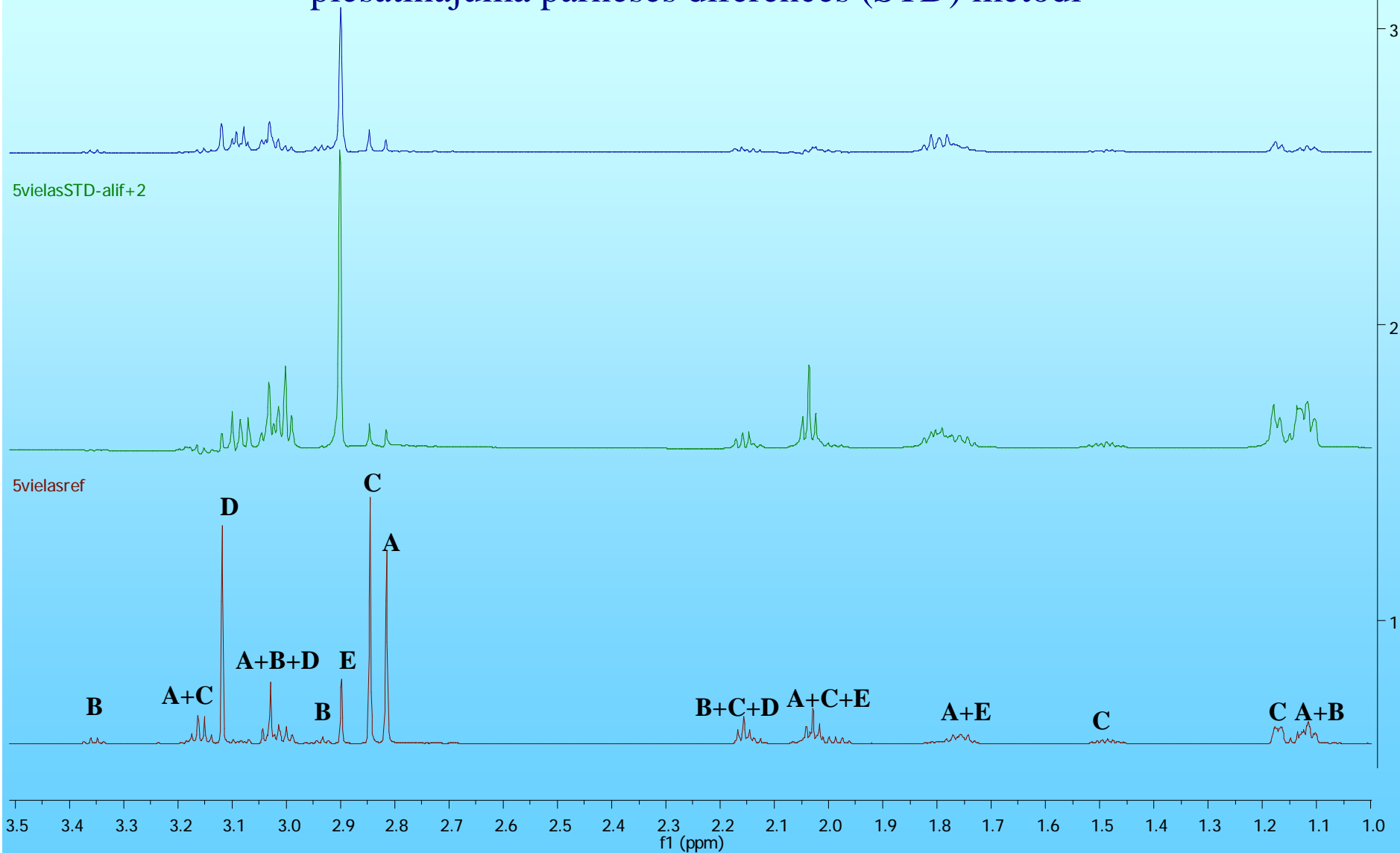
SPvielas+enz





5vielasSTD-arom+2

Piecu GBB analoģu saistības salīdzinājums ar konkurējošo ligandu piesātinājuma pārneses diferences (STD) metodi





Farmakoforā modeļa konstruēšana

Datubāzes izveide un sadalījums

78 savienojumi

↓ + stereoizomēri

89 savienojumi

↓ - garas ķēdes

84 savienojumi

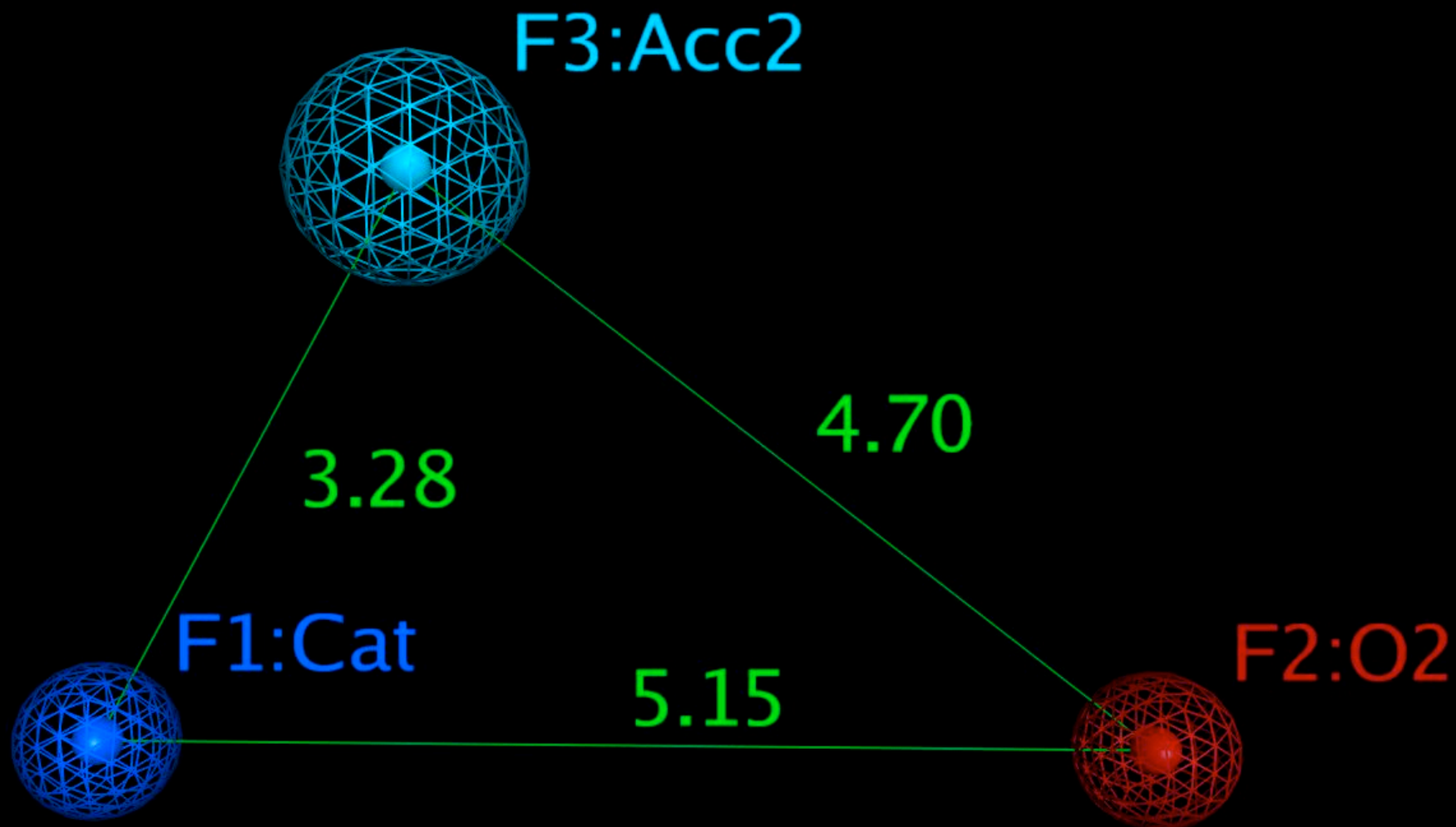
↓ konformāciju ģenerēšana

4854 konformācijas

<100 μM – aktīvie	(24)
100-500 μM – vidēji aktīvie	(17)
>500 μM – neaktīvie	(43)

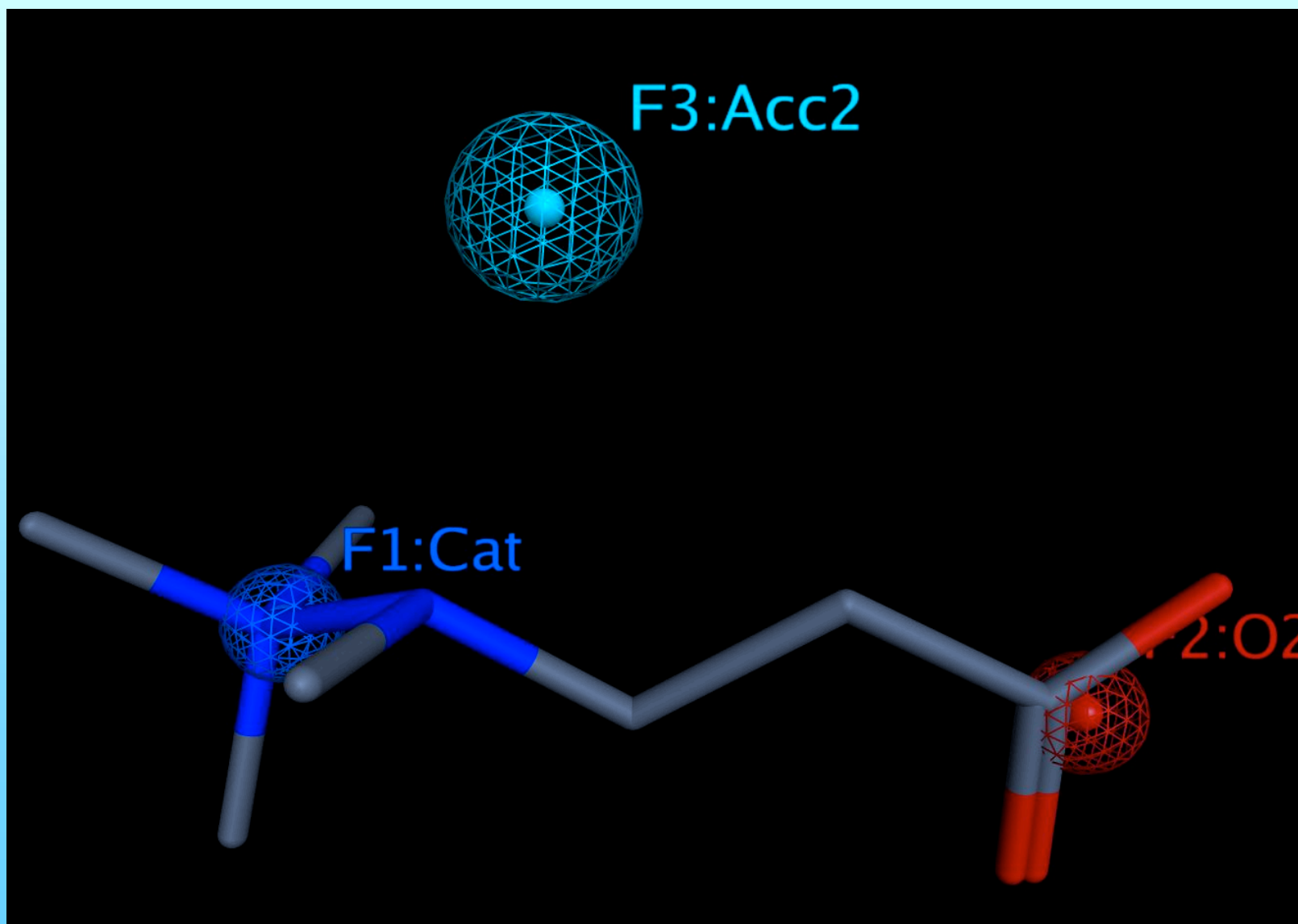


Iegūtais farmakoforais modelis



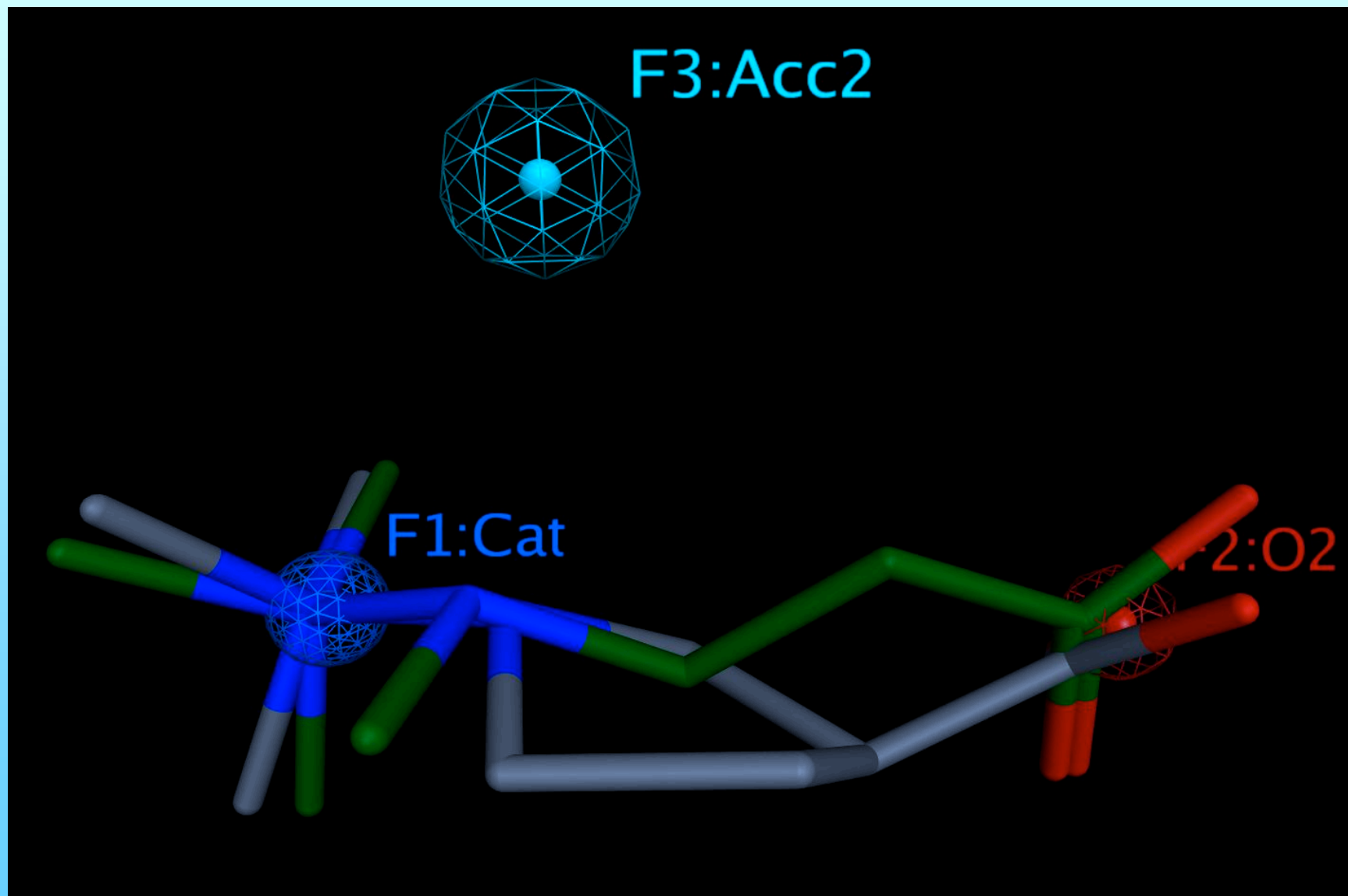


Mildronāta molekulas sakritība ar iegūto farmakoforo modeli





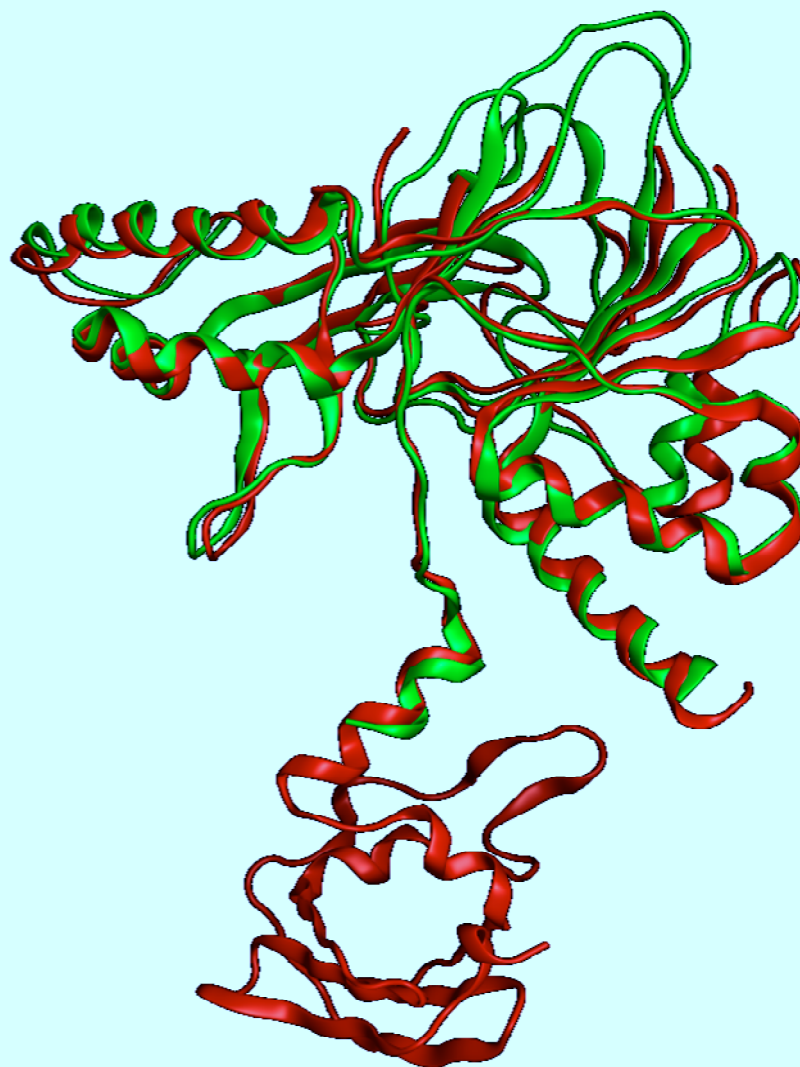
Mildronāta molekulas un potenciālā liganda pārklājums un sakritība ar farmakoforo modeli





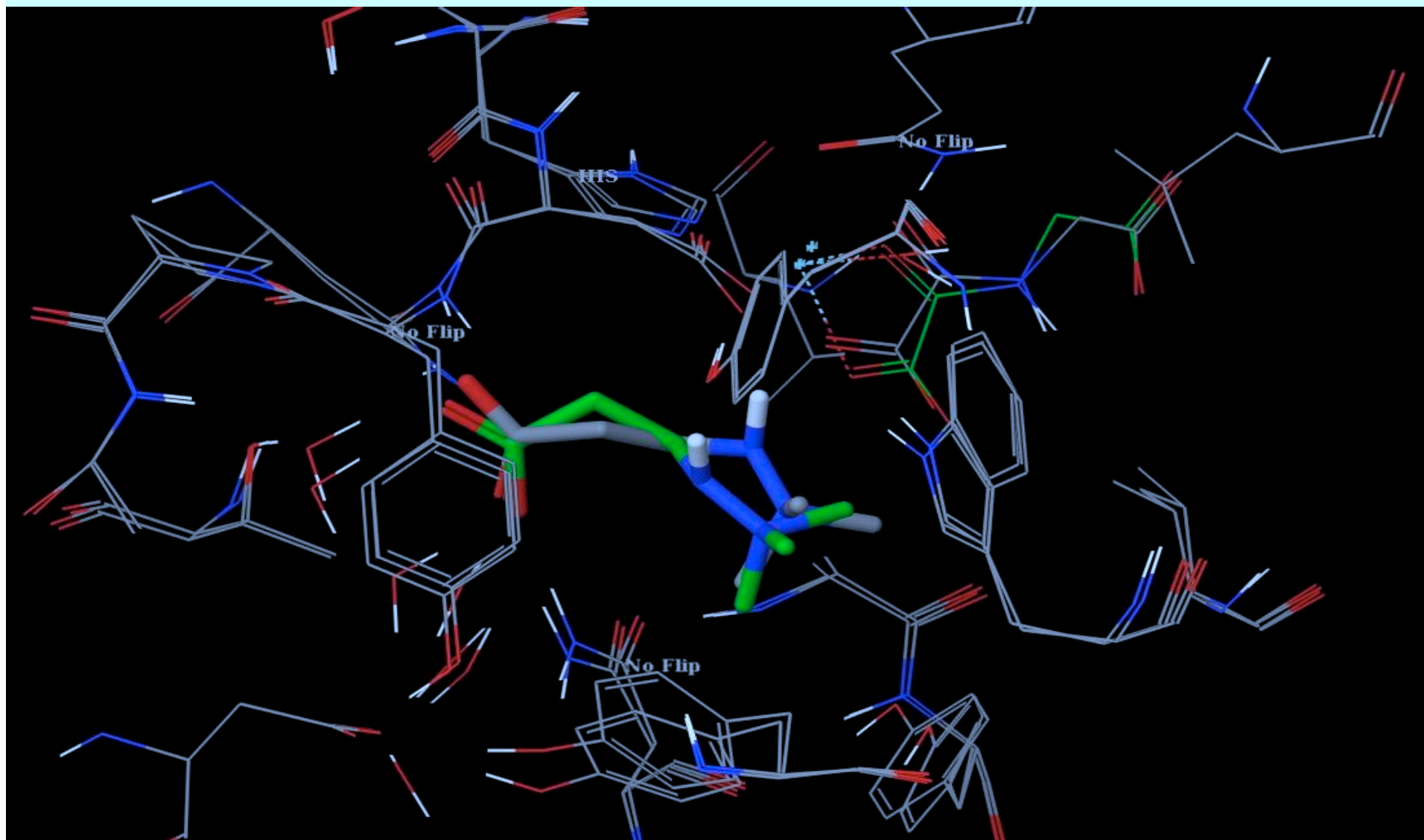
Aktīvā centra modelēšana, izmantojot BMC grupas un Oksfordas zinātnieku grupas iegūtos GBBH struktūras datus

 BMC
 OX





GBBH aktīvā centra modelēšana
(*mildronāta novietojums enzīma aktīvajā centrā*)

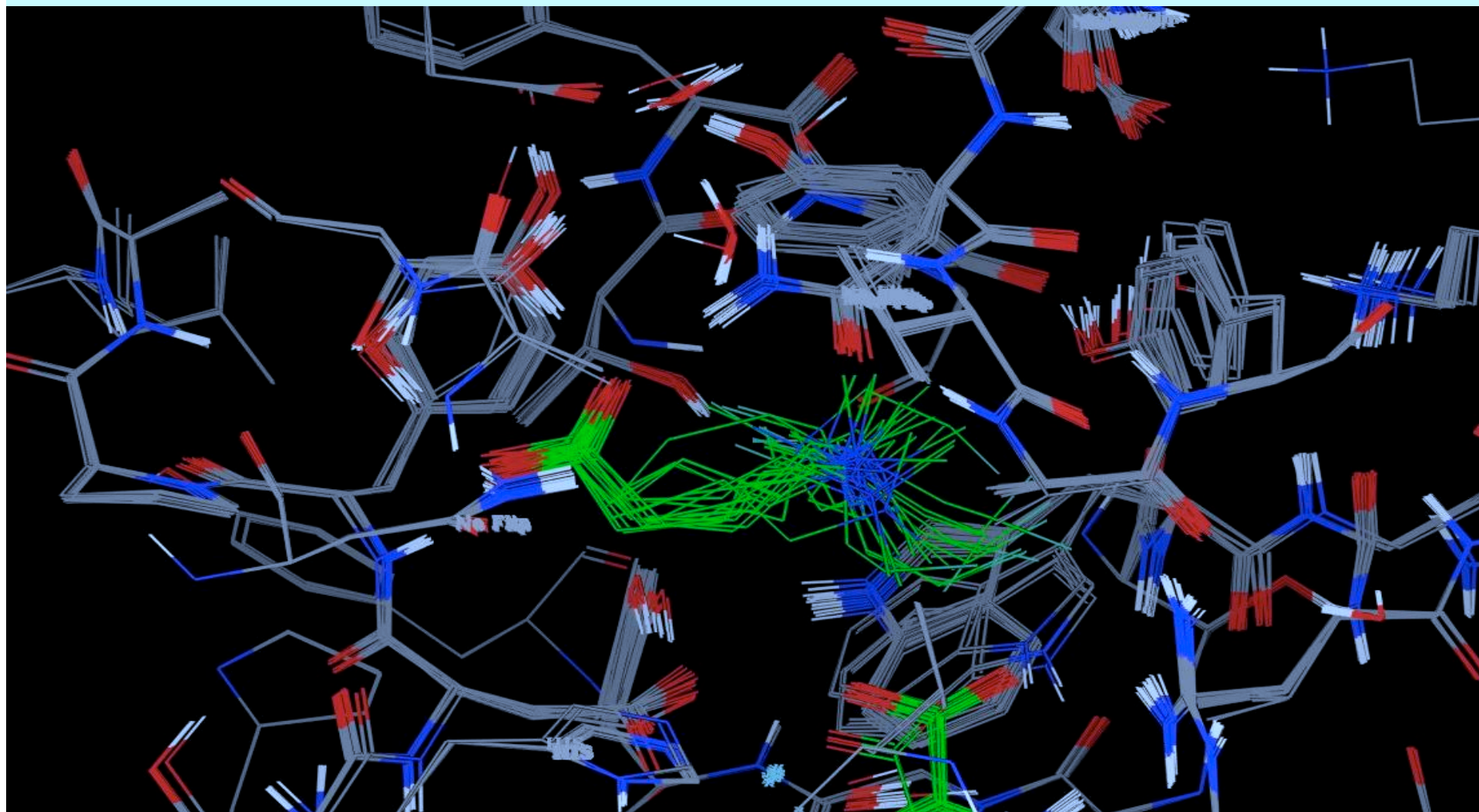


Latvijas Organiskās sintēzes institūts



GBBH aktīvā centra modelēšana

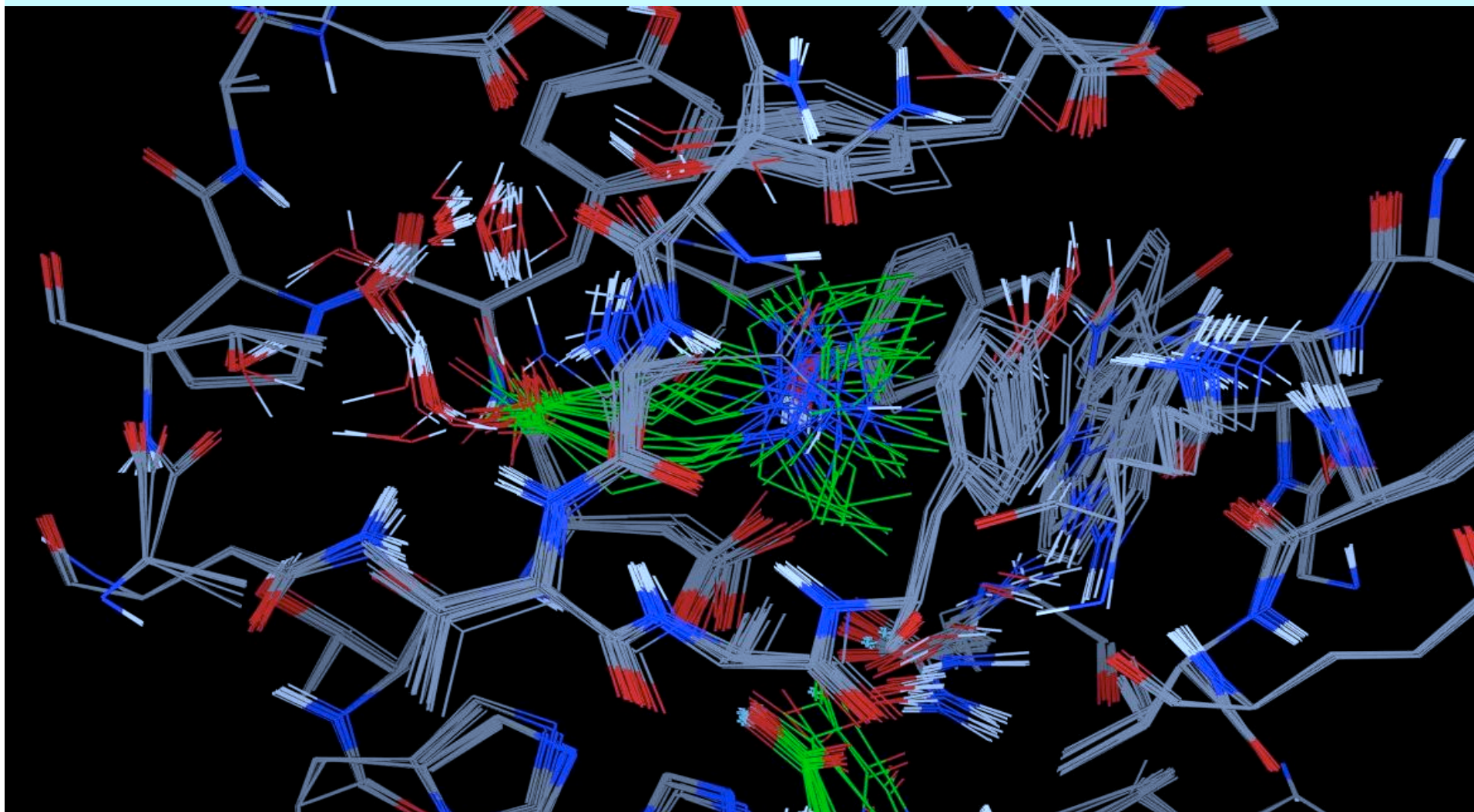
(mildronāta homologa novietojums enzīma aktīvajā centrā, iegūtie rezultāti atbilst aprēķinātajam farmakofooram modelim)





GBBH aktīvā centra modelēšana

(augstāka mildronāta homologa novietojums enzīma aktīvajā centrā, savienojums ar zemāku eksperimentāli noteikto aktivitāti uzrāda lielāku kustīgumu)



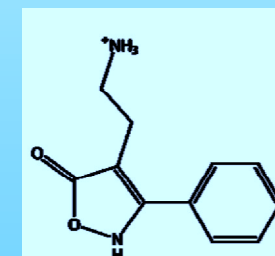
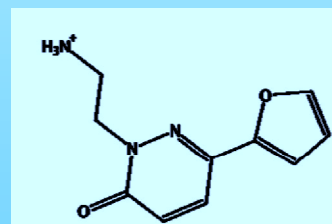
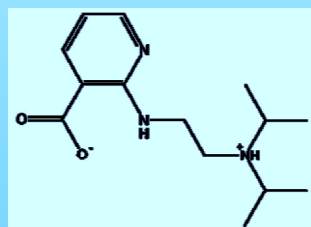
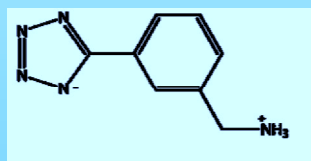
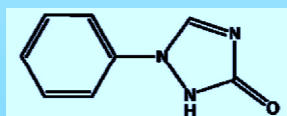
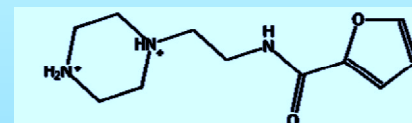
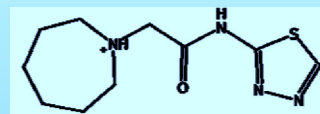
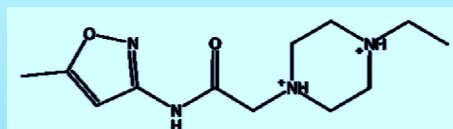
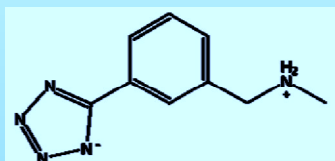


Virtuālā skrīninga izmantošana jaunu GBBH inhibitoru struktūru ģenerēšanā

Divu soļu skrīninga pieeja:

1. HTVS - datubāze ar 10'000 potenciālajiem ligandiem
2. XP ievietošanas algoritms – datubāze ar 200 labākajām struktūrām

Labākās ligandu struktūras:

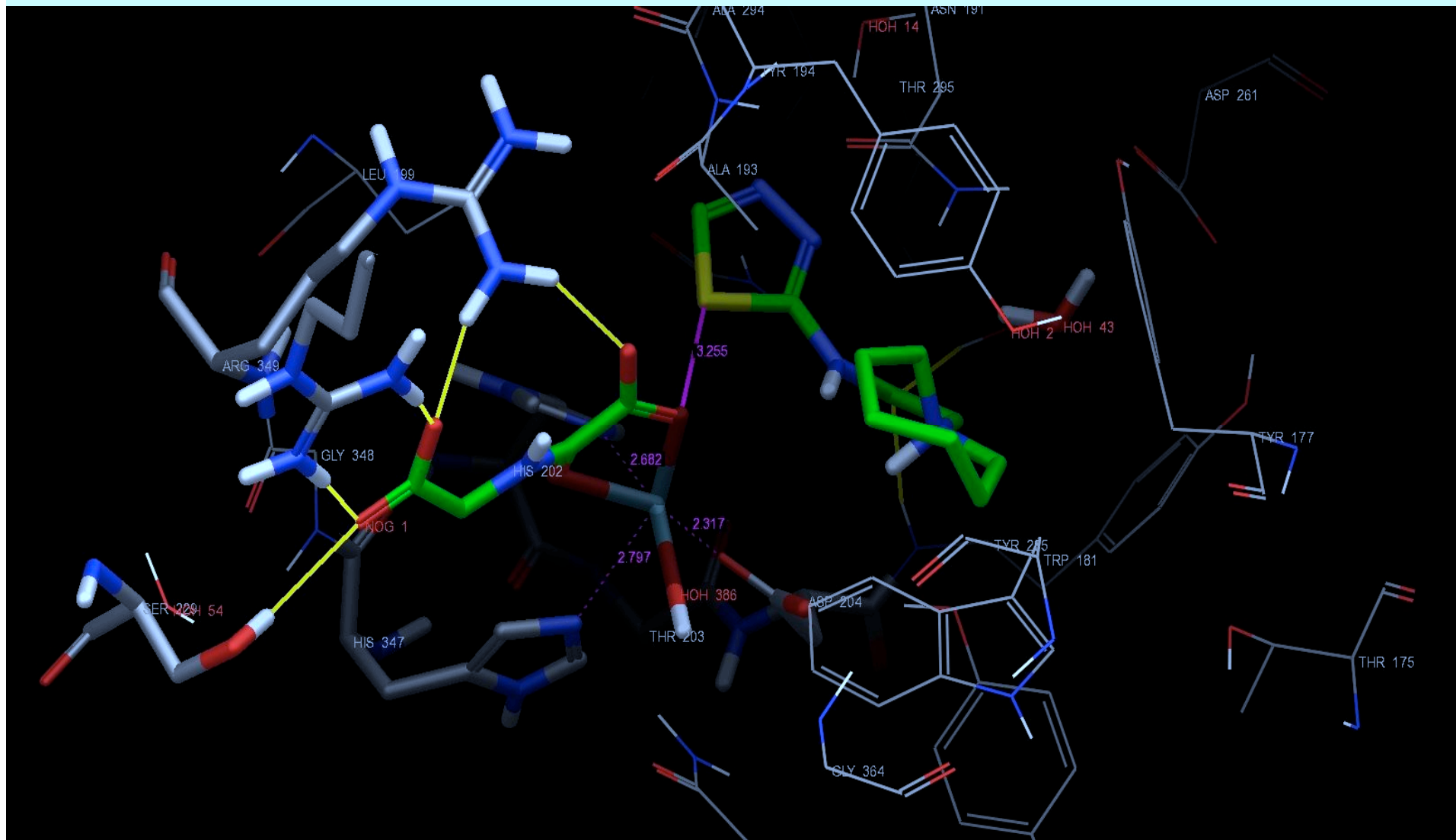


Ģenerēto ligandu saistības kvalitātes rādītāja vērtības: no -14.2832 (labākais) līdz
-11.3541 (sliktākais).

Atbilstošā vērtība mildronāta gadījumā – -10.1154



Labākās ģenerētās liganda struktūras ievietošanas rezultātu vizualizācija
(*Gscore* = -14.2832)





Rezultātu kopsavilkums

- Izmantojot pieejamos datus par karnitīna acetiltransferāzes (CrAT) telpisko struktūru un kodolmagnētiskās rezonances (KMR) eksperimentu rezultātus, noskaidrots karnitīna saistības veids enzīma aktīvajā centrā
- Ar virtuālā skrīninga metodēm ģenerētas perspektīvas potenciālo ligandu struktūras, kuru saistības kvalitāte varētu būt līdzīga karnitīna saistības kvalitātei
- Aprēķināts γ -butirobetaīna hidroksilāzes (GBBH) inhibitoru farmakoforais modelis
- Kombinējot KMR un rentgenstruktūranalīzi ar virtuālā skrīninga metodēm atlasītas perspektīvas jaunu inhibitoru struktūras, kas atbilst aprēķinātajam farmakoforajam modelim