

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A
KONTROLY LÉČIV



**MOLEKULÁRNĚ MODELOVACÍ STUDIE
POTENCIÁLNÍCH INHIBITORŮ MYKOBAKTERIÁLNÍ
ENOYL-REDUKTASY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.

Hradec Králové 2016

František Slovák

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....

František Slovák

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Pracoviště: Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomant: **František Slovák**

Vedoucí práce: **PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.**

Název diplomové práce: **Molekulárně modelovací studie potenciálních inhibitorů mykobakteriální enoyl-reduktasy.**

Tuberkulóza je celosvětově rozšířené infekční onemocnění. Největším problémem dnešní doby jsou multi a kompletně rezistentní kmeny *Mycobacterium tuberculosis*, které nereagují na žádná dosud známá léčiva. Hlavním důvodem vysoké odolnosti a lékové rezistence bacila je složení jeho buněčné stěny. Ta obsahuje vysoký podíl mykolových kyselin. Syntéza mykolových kyselin probíhá v několika krocích. Finálním krokem je katalytická redukce enzymem enoyl ACP-reduktázou (InhA).

Tato práce byla zaměřena na hledání nových potenciálních látek, které by byly schopné tento enzym inhibovat. K hledání těchto látek bylo použito metod výpočetní technologie a molekulového modelování. Úprava krystalografických struktur proběhla v programu Maestro a dockování v programu MOE. Pomocí molekulového dockingu bylo na 3 krystalografických strukturách enzymu InhA otestováno přes 30 000 molekul z databáze ZND (Zink natural derivatives). Z tohoto počtu bylo vybráno 8 molekul, jejichž výsledky po provedení dockingu nasvědčovaly tomu, že tyto molekuly mají potenciální inhibiční účinek.

Abstract

Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Diplomate: **František Slovák**

Supervisor: **PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.**

Title of Diploma Thesis: **Molecular modeling study of potential mycobacterial enoyl ACP reductase inhibitors.**

Tuberculosis is a worldwide spread infectious disease. The biggest problem of our time are completely and multi resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* that do not respond to currently known drugs. The main reason for high resistance and drug resistance is a bacillus composition of its cell wall. It contains a high proportion of mycolic acids. The synthesis of mycolic acids takes several steps. The final step is a catalytic reduction by enzyme enoyl - ACP reductase (InhA).

This work was focused on finding new potential substances that would be able to inhibit this enzyme. There were used methods of computing and molecular modeling to search these substances. Adjusting of crystallographic structures ran in the program Maestro and docking in the MOE program. Over the 30 000 thousand molecules from the ZND (Zinc Natural Derivates) were tested by molecular docking on 3 crystallographic structures of InhA enzyme. 8 of these molecules were selected from this amount because their docking results suggest that these molecules have potential inhibitory effect.

Obsah

Abstrakt	3
Abstract.....	4
1. Úvod a cíl práce	4
2. Teoretická část	5
2.1. Historie a etiopatogeneze tuberkulózy	5
2.2. Morfologie MBT	5
2.2.1. Mykolové kyseliny v MBT	6
2.2.2. Syntéza buněčné stěny MBT	7
2.2.2.1. FAS I	7
2.2.2.2. FAS II	7
2.2.2.2.1. Enzym Enoyl-ACP reductáza InhA	9
2.2.2.2.2. Role Tyrosinu 158.....	11
2.3. Zdroj a přenos TBC.....	11
2.4. Manifestace TBC	11
2.4.1. Primární	11
2.4.2. Postprimární.....	12
2.4.3. Klinický obraz.....	12
2.5. Současná léčba TBC	12
2.5.1. Léčiva první linie	13
2.5.1.1. Rifampicin	13
2.5.1.2. Isoniazid	13
2.5.1.3. Pyrazinamid	14
2.5.1.4. Etambutol	14
2.5.1.5. Streptomycin.....	15
2.5.2. Léčiva druhé linie	15
2.6. Známé inhibitory Enoyl-ACP reductázy	16

2.6.1.	Přímé inhibitory	16
2.6.1.1.	Triklosan.....	17
2.6.1.2.	Difenyl ethery	18
2.6.1.3.	Indol-5-amidy	19
2.6.1.4.	Pyrrolidin karboxamidy.....	19
2.6.1.5.	Arylamidy.....	20
2.6.1.6.	Methyl-thiazoly	20
2.6.2.	Nepřímé inhibitory.....	21
2.6.2.1.	Isoniazid	21
2.6.2.2.	Ethionamid	21
2.7.	Počítačová chemie.....	22
2.7.1.	Virtuální screening.....	22
2.7.1.1.	Vybrané metody VS.....	23
2.7.1.1.1.	Farmakofor	23
2.7.1.1.2.	Docking	23
3.	Experimentální část.....	25
3.1.	Příprava enzymů.....	25
3.2.	Příprava ligandů	26
3.3.	Docking v programu MOE.....	26
3.3.1.	Redocking	26
3.3.1.1.	1P44	27
3.3.1.2.	2X23	27
3.3.1.3.	4TZK	28
3.3.1.4.	Výsledné nastavení.....	29
3.3.2.	Screening databáze pomocí dockingu.....	29
3.3.3.	Farmakofor.....	30
3.3.4.	Induced fit	30

4.	Výsledky a diskuze	32
4.1.	Sloučenina 4 Zinc01107285.....	36
4.2.	Sloučenina 9 Zinc04237420.....	39
4.3.	Sloučenina 10 Zinc04237438.....	41
4.4.	Sloučenina 11 Zinc04237445.....	43
4.5.	Sloučenina 13 Zinc04278035.....	45
4.6.	Sloučenina 15 Zinc05415069.....	48
4.7.	Sloučenina 17 Zinc08643197.....	50
4.8.	Sloučenina 18 Zinc19372079.....	52
5.	Závěr	55
	Seznam použitých zkratk	56
	Seznam obrázků a tabulek	57
	Použitá literatura	59

1. Úvod a cíl práce

Tuberkulóza je infekční onemocnění, které je vyvoláno bakterií *mycobacterium tuberculosis*. Toto onemocnění se řadí mezi ty, které způsobují celosvětově nejvíce úmrtí. Ročně na toto onemocnění zemře podle WHO zhruba 1,5 mil. lidí [1]. Vzhledem k vysokému počtu úmrtí, některým nežádoucím účinkům současné léčby, a také díky stále častější lékové rezistenci je potřeba nalézat a vyvíjet nová, účinná a bezpečná léčiva, nezbytná v boji proti tomuto onemocnění.

In silico testování a zvláště pak molekulový docking je relativně nová, ale v dnešní době již celkem běžná součást výzkumu. Molekulové modelování nachází největší uplatnění při vývoji léčiv na půdě univerzit i společnosti, které jej využívají v hledání a v preklinickém testování nových potenciálních léčiv (např. predikce ADME charakteristik). Výhodou této metody je především rychlost a nenákladnost. Určitý problém pak představuje velké množství falešně pozitivních i falešně negativních výsledků.

Molekulový docking můžeme zařadit pod odvětví počítačové chemie. Toto odvětví se neustále vyvíjí a nachází uplatnění napříč všemi obory přírodních věd. Rozvoj metody molekulového dockingu umožnil především pokrok počítačového hardwaru, vývoj nových softwarů pro virtuální screening a velký počet krystalograficky popsaných struktur proteinových receptorů.

Cílem této práce je za pomoci virtuálního screeningu identifikovat potenciální inhibitory mykobakteriální enoyl-ACP reduktázy. Z metod virtuálního screeningu byly použity molekulový docking a metoda farmakoforu. Databáze sloučenin použitých při této práci byla vybrána tak, aby tyto sloučeniny byly komerčně dostupné.

Dílčím cílem bylo nalezení optimálního nastavení parametrů pro dockovací funkci software MOE (Molecular Operating Environment).

2. Teoretická část

2.1. Historie a etiopatogeneze tuberkulózy

Tuberkulóza (TBC) je celkové infekční onemocnění, které se řadí mezi specifické zánětlivé procesy. Název tuberkulóza pochází z latinského *tuberculum* = uzlíček, neboť je to jeden z anatomicky-patologických jevů provázející onemocnění [2]. Důkazy o onemocnění TBC se prokázaly již na archeologických vykopávkách z Egypta.

Druhy mykobakterií, které způsobují onemocnění TBC, označujeme jako *Mycobacterium tuberculosis* complex. Tento komplex zahrnuje *Mycobacterium tuberculosis* (MBT), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, a bacil Calmette-Guérinův. Případy onemocnění v ČR má na svědomí výhradně MBT [2][3].

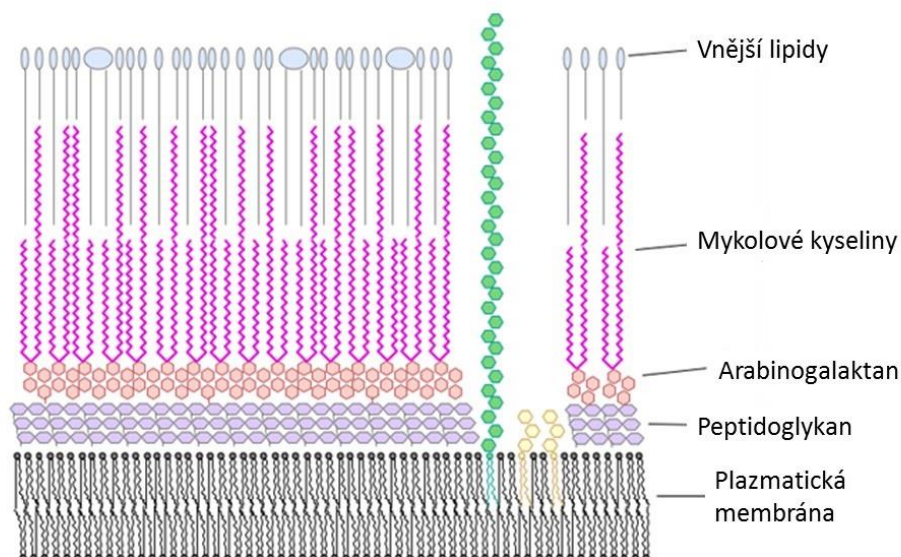
MBT byla poprvé objevena Robertem Kochem (odtud Kochův bacil) roku 1882 [2]. MBT taxonomicky spadá do rodu *Mycobacterium*, čeledi *Mycobacteriaceae* a řádu *Actinomycetales* [4]. V roce 1975 bylo známo asi 30 druhů *Mycobacterium*, v roce 2016 to už je 175 druhů a 13 poddruhů [5].

2.2. Morfologie MBT

MBT se pod mikroskopem jeví jako štíhlé, lehce zahnuté granulované tyčinky, které se vyskytují buď samostatně, nebo tvoří shluky. Samostatné mykobakterie pak dosahují délky 1-4 μm a šířky 0,3 až 0,6 μm . Jedná se o obligátní aerobní bakterie. Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o acidorezistentní, alkalorezistentní a alkoholrezistentní organismy [6].

Jedním z důvodů, proč je MBT i v 21. století stále významná hrozba pro zdraví celosvětové populace, je stavba vnějších obalů mykobakterií. Přesněji pak buněčné stěny. Jejich unikátní složení pomáhá bacilu přežít extrémní změny vnějšího prostředí. Např. desikaci či osmotický šok. Dále jej chrání i proti imunitnímu systému hostitele, a tím výrazně přispívá k virulenci bacilu. V neposlední řadě stavba buněčné stěny přispívá k rezistenci na antibiotickou léčbu. Stavba vnějšího obalu je také důvodem, proč je bakterie neobarvitelná pomocí Gramova barvení [7,8].

Vnější vrstva buněčné stěny se skládá jak z lipidů, tak z proteinů. Vnitřní vrstva obsahuje peptidoglykan, arabinogalaktan a mykolové kyseliny (MK). Tyto tři složky jsou kovalentně spojeny do komplexu. Tento komplex začíná u plazmatické membrány peptidoglykanem, pokračuje arabinogalaktanem a k vnější vrstvě se pak pojí MK [9].



Obr. 1 Stavba buněčné stěny MBT

2.2.1. Mykolové kyseliny v MBT

MK jsou β -hydroxy mastné kyseliny s velmi dlouhými α -alkylovými řetězci. V MBT se vyskytují 3 základní skupiny MK: α -mykolové kyseliny, methoxy mykolové kyseliny a ketoxy mykolové kyseliny. Poslední 2 jmenované mohou být navíc ve formě cis nebo trans. Z toho vyplývá, že ve struktuře buněčné stěny MBT můžeme nalézt 5 různých forem MK v různém procentuálním zastoupení. Přičemž α -mykolové kyseliny jsou zastoupeny zhruba ze 70 a více procent. Zbylých 30 a méně procent zastávají methoxy a ketoxy mykolové kyseliny. Mykolové kyseliny dodávají bakterii MBT vysokou hydrofobicitu, chrání bakterie před imunitním systémem hostitele, stejně jako před účinky běžně používaných antibiotik a jsou tak důležitým faktorem virulence bakterie.[10]

2.2.2. Syntéza buněčné stěny MBT

Na syntéze buněčné stěny MBT se podílejí 2 systémy. FAS I a FAS II z anglického fatty acid synthase. [10]

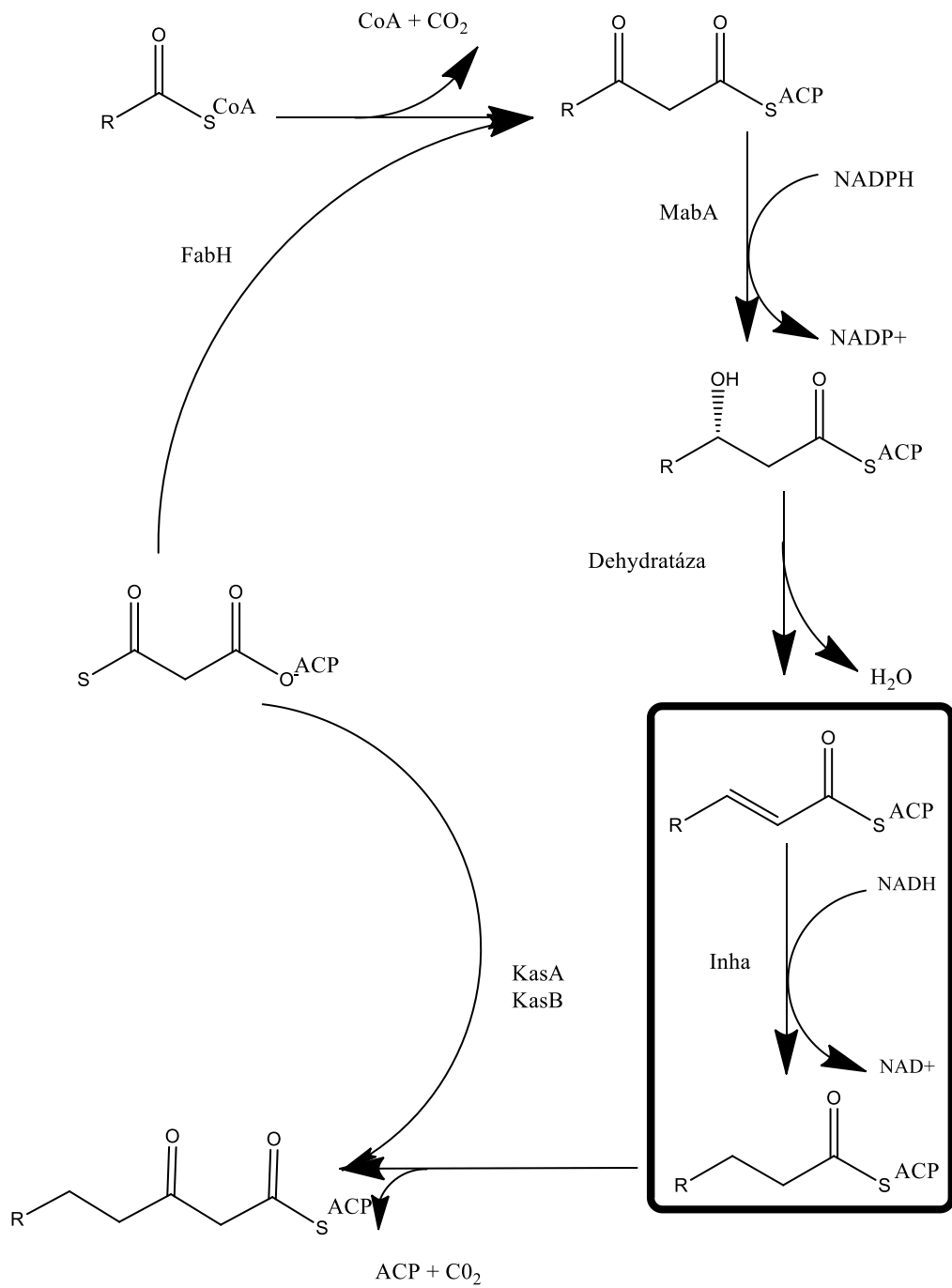
2.2.2.1. FAS I

FAS I je tvořen jedním polypeptidickým multienzymovým komplexem. Tento enzym je zodpovědný za tvorbu krátkých esterů acetyl koenzymu A. Další elongací vznikají 16C a 18C deriváty. Ty slouží primárně ke tvorbě membránových fosfolipidů. Další elongací těchto derivátů vznikají 20C a 26C deriváty, které ve formě derivátů s acetyl koenzymem A slouží jako prekurzory pro další zpracování v procesu tvorby mykolových kyselin, a tedy i buněčné stěny MBT.[10]

2.2.2.2. FAS II

Naproti tomu FAS II je systém na sebe navzájem navazujících enzymů.

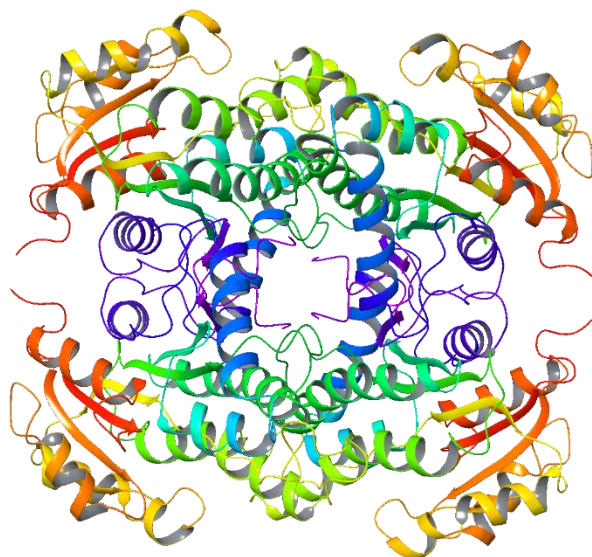
Jako první v tomto enzymatickém cyklu je β -ketoacyl ACP syntáza FabH (EC 2.3.1.180). Ta katalyzuje kondenzaci mezi acylem koenzymem A a malonylem-ACP [11]. Produkt této kondenzace je následně redukován dalším enzymem cyklu 3-ketoacyl-ACP reduktázou MabA (EC 1.1.1.100). V dalším kroku je produkt předchozí reakce dehydratován pomocí dosud nepopsané hydroxyl-acyl-ACP dehydratázy. Dalším krokem je opět redukce. Produkt dehydratázy je redukován pro inhibici syntézy buněčné stěny MBT klíčovým enzymem enoyl-ACP reduktázou InhA (EC 1.3.1.9). Na konci cyklu stojí enzymy KasA a KasB (EC 2.3.1.41) β -ketoacyl-ACP syntázy, které katalyzují kondenzaci produktu předchozích reakcí a malonyl-CoA.[13]



Obr. 2 FAS II dráha syntézy; FabH: b-ketoacylACP syntáza; MabA: 3-ketoacyl-ACP reduktáza; Inha: Enoyl-ACP-reduktáza a KasA, KasB: b-ketoacyl-ACP syntáza

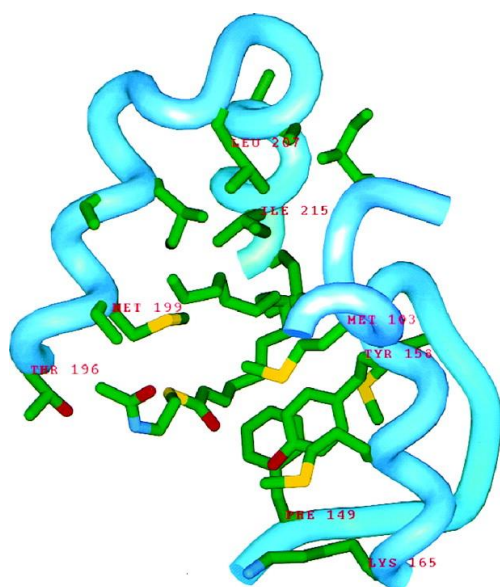
2.2.2.2.1. Enzym Enoyl-ACP reduktáza InhA

InhA se řadí do nadrodiny enzymů označovaných jako dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem. Samotný enzym je tvořen čtyřmi podjednotkami. Tato struktura se označuje jako homotetramer. (**Obr. 3**).



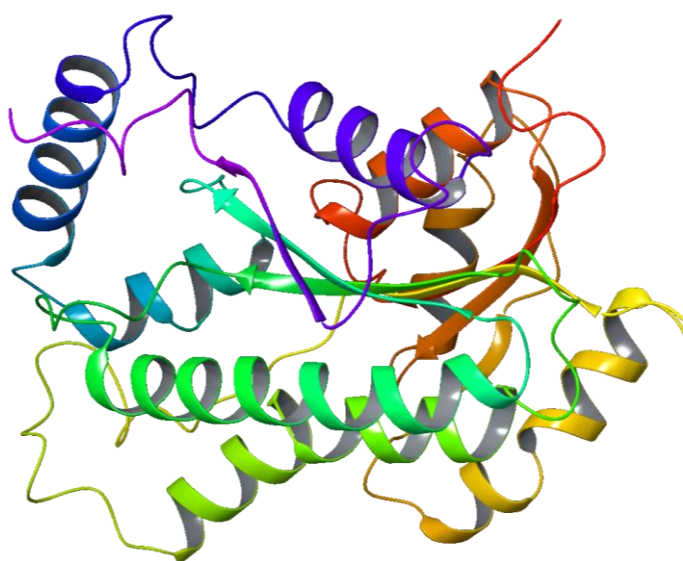
Obr. 3 Homotetramer InhA 2x23

Charakteristickým stavebním prvkem podjednotek této nadrodiny enzymů je přítomnost tzv. Rossmanova záhybu. Ten je složen z 6-7 paralelně uspořádaných β -skládaných listů, které jsou z každé strany obklopeny 3-4 α -helixy. (**Obr. 5**) [14].



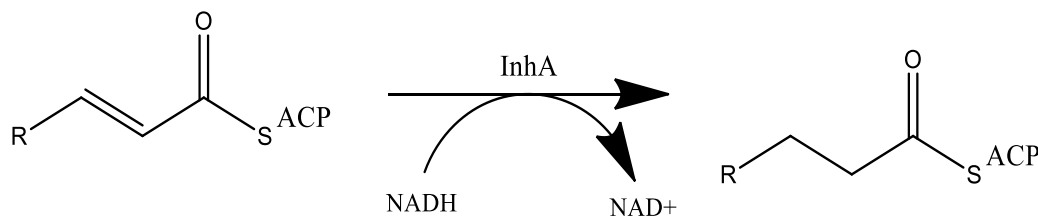
Obr. 4 vazebné místo pro substrát s jeho rezidui [15; upraveno]

Aktivní místo enzymu InhA je tvořeno katalytickou triádou (Phe149-Tyr158-Lys165). Vazebné místo pro substrát, které určuje substrátovou specifitu, je umístěno na C-konci polypeptidového řetězce a má tvar písmene U. Vazebné místo pro substrát obsahuje tato rezidua (Met 103, Phe 149, Tyr 158, Lys 165, Thr 196, Met 199, Leu 207 and Ile 215) a ty tvoří oválnou šterbinu. Z jedné strany je šterbina kompletně otevřená, druhá strana však obsahuje jen malé volné prostory. Vzhledem k tomu, že substrátem pro InhA jsou delší řetězce acylů mastných kyselin, je vazebné místo tohoto enzymu větší a tvoří hlubší šterbinu. Tímto se odlišuje od jiných bakterií, které taktéž mají enoyl-ACP reduktázu.[15]



Obr. 5 Jedna ze čtyř podjednotek InhA.

InhA můžeme zařadit mezi NADH dependentní oxidoreduktázy. Jeho role je klíčová pro syntézu mykolových kyselin. InhA katalyzuje reakci, při které je hydridový anion z kofaktoru NADH přenesen na C3 uhlík substrátu, a tím dochází k redukci dvojně vazby mezi uhlíky C2-C3 substrátu.[16]



Obr. 6 Redukce dvojně vazby pomocí InhA

2.2.2.2. Role Tyrosinu 158

Tyrosin 158 společně s Phe149 a Lys165 tvoří katalytickou triádu, která se vyskytuje v aktivním místě enzymu InhA.

Klíčovou roli mezi těmito rezidui má Tyr 158. Role Tyr158 spočívá v jeho funkci, kdy při katalytické redukci substrátu předá proton z hydroxylové skupiny svého postranního řetězce na karbamoylový kyslík C₁ uhlíku substrátu, a tím vytvoří enolátový aniont. Vytvoření tohoto enolátového aniontu hraje zásadní roli v redukci dvojné vazby mezi uhlíky C2-C3 substrátu popsáno v předchozí kapitole.

Zároveň Tyr 158 tvoří podobně jako Lys165 vodíkovou vazbu s molekulou NADH, tím způsobuje deprotonizaci 2'-hydroxylové skupiny ribózy NADH.[16]

2.3. Zdroj a přenos TBC

Zdrojem nákazy bývá nejčastěji člověk. Zvláště pak člověk nakažený TBC dýchacího ústrojí. Vzhledem k tomu, že při propuknutí onemocnění u hospodářských zvířat jsou tato zvířata okamžitě likvidována, je přenos z hospodářského zvířete na člověka vzácný.

Nejčastější cestou přenosu je cesta inhalační. Mezi méně časté cesty přenosu řadíme přímý kontakt. Jde především o profesní nákazy. Lidé, kteří přichází do kontaktu s infikovaným materiálem (lékaři, veterináři, mikrobiologové).

Mezi velmi vzácné cesty se řadí: přenos krví z matky infikované TBC na plod a přenos potravou. [17]

2.4. Manifestace TBC

Manifestace onemocnění probíhá u akutní formy TBC a má 2 fáze. Primární a postprimární.

2.4.1. Primární

Primární fáze onemocnění mívá asymptomatický průběh a často dochází k samovolnému zhojení. Nastává většinou v dětském věku při prvotním setkání mykobakterie s hostitelem. V místě průniku se vytvoří zánětlivé ložisko. Bacil poté putuje do okolních mízních uzlin a do plic. V plicích vytvoří ložiska zvané tuberkulózní komplex. V této fázi se může klinicky manifestovat, ale nemusí se projevit ani klinicky

ani na RTG snímku plic. V 90% dochází k samovolnému vyhojení tuberkulózních ložisek. Ložisko se opouzdří vazivem, později kolagenem a nakonec kalcifikuje. Vzniká tuberkulózní kaverna, která může svědčit o průběhu primární TB. Zároveň však může sloužit jako zdroj reinfekce. Pokud by došlo k oslabení imunitního systému hostitele, může se z této kaverny bakterie uvolnit a propuknout v postprimární fázi onemocnění.

2.4.2. Postprimární

Propuká u pacientů již dříve vystaveným MBT. Jako spouštěč může být oslabená imunita, masivní vystavení exogennímu MBT, HIV, diabetes, ale i užívání léků např. vysoké dávky imunosupresiv či kortikosteroidů.

Postprimární fáze bývá výhradně plicní onemocnění. Zánět začíná nejčastěji v oblasti plicního hrotu, vzniká tzv. Aschoffův infiltrát. V tomto infiltrátu se tvoří nekrotizující ložisko. Nekróza se poté buď zhojí, nebo se rozšíří a obsah ložiska je vykašláván, a tím se infekce šíří do okolí. Při spolknutí infikovaného sputa hrozí rozšíření zánětu i do zažívacího traktu. Další progresí nemoci nastává fáze TBC označována jako kavernózní TBC. Tvoří se dutiny (kaverny), které mohou zasahovat až do stěn tepen na plicích a pacient pak umírá buď tak, že vykrváčí nebo se zadusí vlastní krví.

2.4.3. Klinický obraz

Vnější příznaky mohou být nejednoznačné. Nejčastěji se jedná o zvýšenou únavu, úbytek hmotnosti, mírné zvýšení teploty. Tyto nenápadné příznaky později přechází v kašel s hnisavou expektorací až po hemoptýzu.[8][17]

2.5. Současná léčba TBC

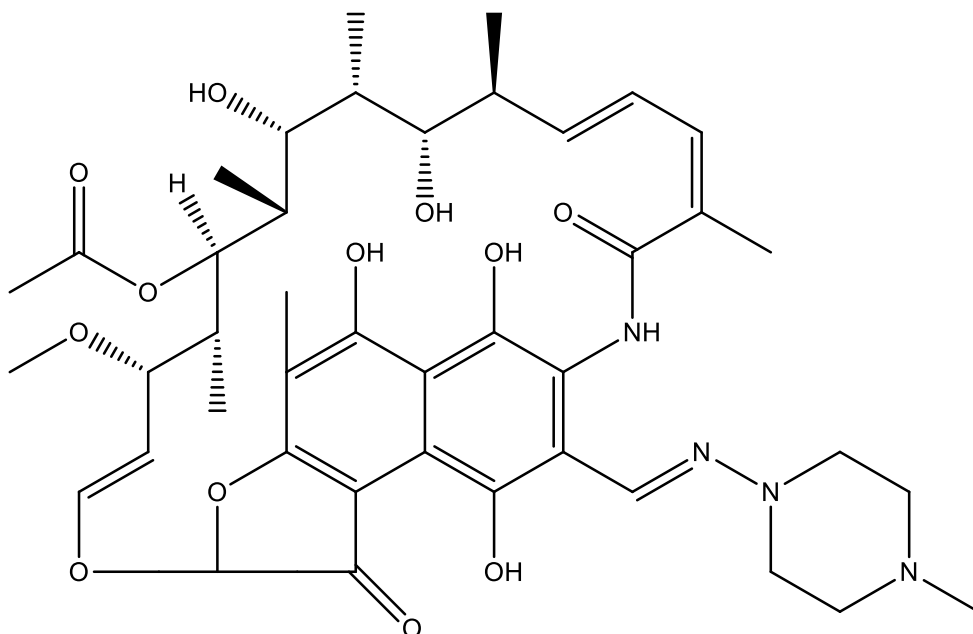
Léčba TBC je vždy dlouhodobá. Běžně trvá 6-9 někdy i 12 měsíců. Léčba je zahájena vždy kombinací léčiv první linie. Používá se čtyř (isoniazid + rifampicin + ethambutol + pyrazinamid) až pěti kombinace léčiv. (+streptomycin). Tato fáze léčby probíhá po dobu 2 měsíců. Po této fázi následuje pokračovací fáze, při které se podává dvojkombinace (isoniazid+rifampicin). Tato pokračovací fáze trvá obvykle 4 měsíce.

Důvodem kombinační léčby u počáteční fáze je stále častější rezistence MBT na léčiva první linie. Jako multirezistentní označujeme takové kmeny MBT, které nejsou

citlivé na dvě nejúčinnější antituberkulotika isoniazid a rifampicin. V profylaxi se uplatňuje monoterapie isoniazidem po dobu 6 měsíců.[18]

2.5.1. Léčiva první linie

2.5.1.1. Rifampicin



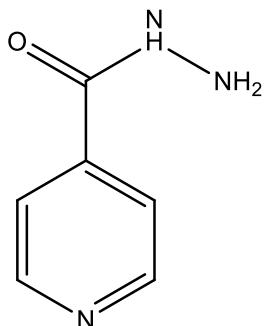
Obr. 7 Rifampicin

Ansamycinové, širokospektré antibiotikum, které působí na rychle i pomalu se množící mykobakterie. Má baktericidní a sterilizační účinek.

Mechanismus účinku: spočívá ve vazbě na DNA-dependentní RNA polymerázu, čímž blokuje syntézu RNA v bakteriích

Nežádoucí účinky: hepatotoxicita, Flu-like syndrom, zbarvení tělních tekutin

2.5.1.2. Isoniazid



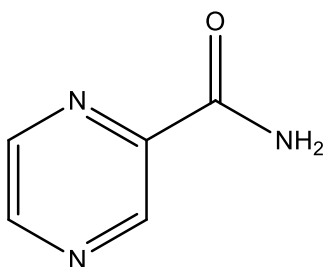
Obr. 8 Isoniazid

Jedná se o hydrazid kyseliny isonikotinové. Společně s rifampicinem je považován za nejúčinnější antituberkulotikum. Působí baktericidně i na mykobakterie uložené intracelulárně.

Mechanismus účinku: Po předchozí enzymatické aktivaci inhibuje enoyl-ACP reductázu viz kapitola 2.6.2.1.

Nežádoucí účinky: periferní neuropatie, hepatotoxicita, interakce s alkoholem

2.5.1.3. Pyrazinamid



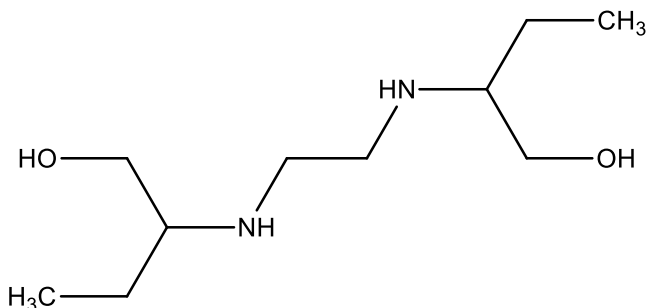
Obr. 9 Pyrazinamid

Pyrazinový derivát nikotinamidu. Působí baktericidně na intracelulárně fagocytované mykobakterie. Je účinný pouze na MBT.

Mechanismus účinku: Neří dosud uspokojivě vysvětlen. Jedna z nejrespektovanějších teorií popisuje konverzi pyrazinamidázou na kyselinu pyrazinkarboxylovou a acidifikaci lumen buňky. Působí pouze v kyselém pH. Z tohoto důvodu je vhodný především v počáteční, zánětlivé fázi onemocnění.

Nežádoucí účinky: hepatotoxicita, hyperurikémie

2.5.1.4. Etambutol



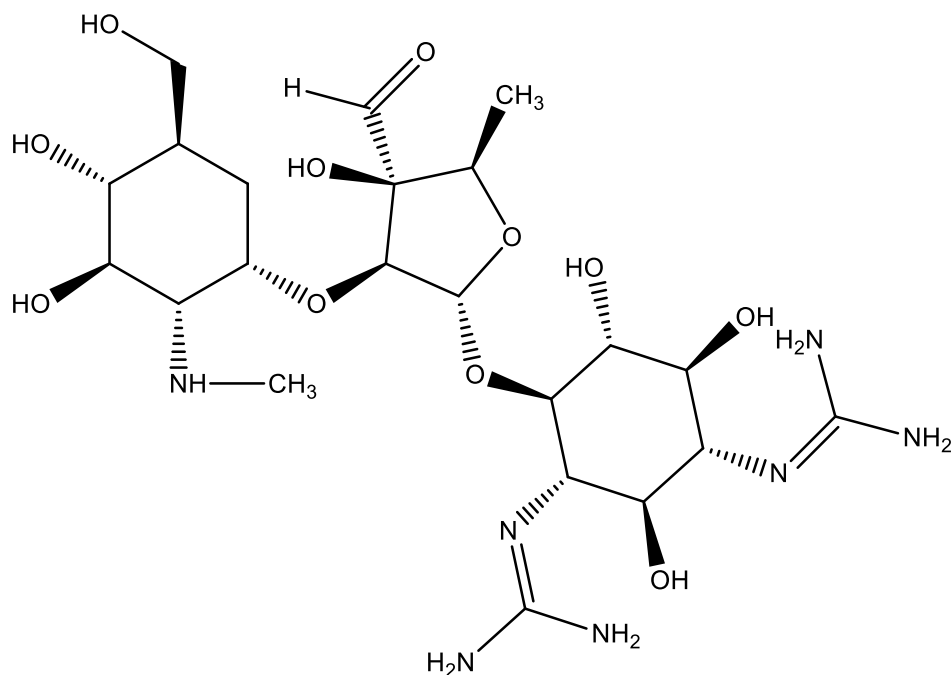
Obr. 10 Etambutol

Má bakteriostatický účinek. Podává se za účelem zabránit vzniku rezistence. V kombinaci zvyšuje baktericidní účinek.

Mechanismus účinku: inhibuje polymeraci arabinosy na arabinan a tím zasahuje do přeměny jedné z komponent buněčné stěny MBT

Nežádoucí účinky: zánět očního nervu, hyperurikémie [18]

2.5.1.5. Streptomycin



Obr. 11 Streptomycin

Aminoglykosidové baktericidní antibiotikum. Působí baktericidně i na extracelulárně lokalizovaná mykobakteria. Někdy je řazen mezi léčiva druhé linie.

Mechanismus účinku: Vazba na 30s podjednotku ribozomu bakterie a tím blokáda proteosyntézy.

Nežádoucí účinky: poškození VIII. hlavového nervu, nefrotoxicita, neuromuskulární blok, neutropenie, trombocytopenie, agranulocytóza, hemolýza [20]

2.5.2. Léčiva druhé linie

Léčiva druhé linie se využívají převážně při rezistenci mykobakterie na léčiva první linie.

Kapreomycin: Cyklické peptidové antibiotikum. Má stejný mechanismus účinku i nežádoucí účinky jako aminoglykosidy. Aplikuje se parenterálně.

Cykloserin: Mechanismus účinku je inhibice syntézy buněčné stěny. Hlavní nežádoucí účinek je častá neurotoxicita.

Ethionamid: Mechanismus účinku je analogický s isoniazidem. Nežádoucí účinky jsou hlavně nevolnost, nauzea, zvracení.

p-aminosalicylová kyselina: Mechanismem účinku je blokáce dihydrofolátreduktázy. Dnes již obsolentní. Díky nízké ceně stále využívána v méně vyspělých zemích. Nežádoucí účinky nechutenství, průjem, kožní reakce.

Dále jsou z řad antibiotik využívány z aminoglykosidů **kanamycin** a **amikacin** a z flourchinolonů pak **ofloxacin** a **ciprofloxacin**. [18]

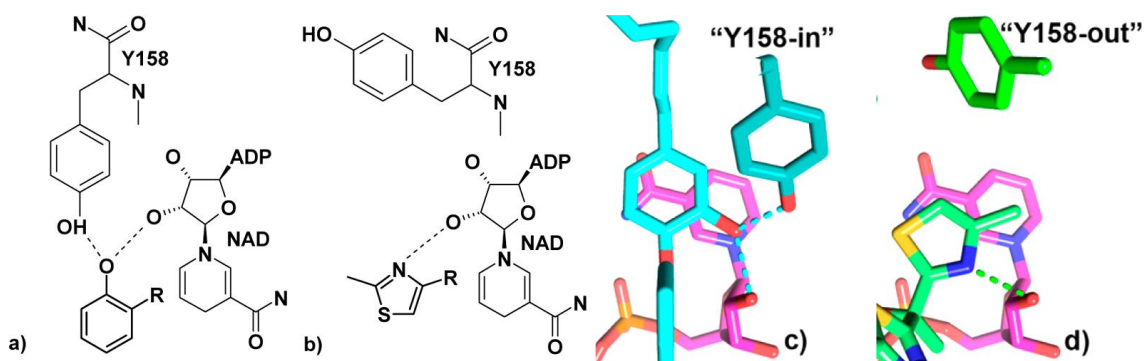
2.6. Známé inhibitory Enoyl-ACP reduktázy

2.6.1. Přímé inhibitory

Sloučeniny dosud publikované v odborné literatuře, které řadíme mezi přímé inhibitory InhA, se strukturně velmi liší. Mechanismus inhibice však mají převážně stejný.

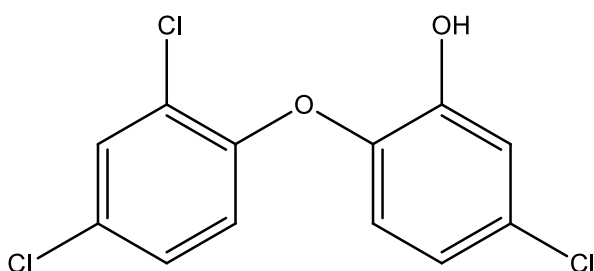
Molekula inhibitoru obsahuje ve své struktuře vždy část, která je elektronegativní. Tato část vytváří důležitou vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou Tyr 158 aktivního místa InhA. Tato síť vodíkových vazeb je rozšířena na 2'-hydroxylovou skupinu ribózy, která je součástí kofaktoru NADH. V blízkosti elektronegativní skupiny bývá navíc nenasycený, nebo aromatický systém, který tvoří π - π interakci s pyridinem molekuly NADH. [21]

Výše popsanému mechanismu inhibice se vymyká skupina methyl-thiazolů. Na rozdíl od výše popsaného mechanismu methyl-thiazoly netvoří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou Tyr158. Navíc methylová skupina methyl-thiazolů stericky natáčí Tyr158 do postavení „out“. Krystalografická struktura InhA (pdb č. 4BQP) naznačila, jakým mechanismem inhibice probíhá. Thiazolový kruh vytváří π - π interakci s nikotinamidovým kruhem. Thiazolový dusík tvoří vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou ribózy NADH. [22]



Obr. 12 Obrázky a) a c) naznačují klasické „in“ postavení Tyr158. Obrázky b) a d) pak postavení „out“ v přítomnosti methyl-thiazolů. [22]

2.6.1.1. Triklosan



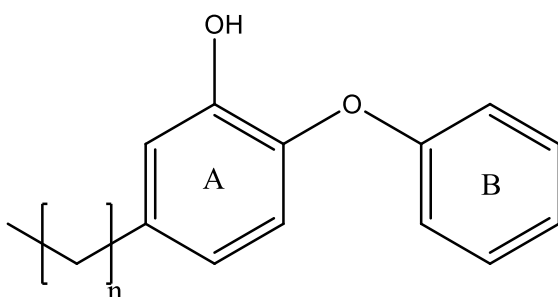
Obr. 13 Chemická struktura triklosanu

Chemicky se jedná o 5-Chloro-2-(2,4-dichloro-fenoxy)-fenol. Můžeme se s ním setkat v domácnostech jako konzervant a jako protimikrobní přísada například v mýdlech, tělových krémech, zubních pastách nebo deodorantech.

Působí jako přímý nekompetitivní inhibitor InhA. V aktivním místě enzymu vytváří výše popsané interakce a tím inhibuje syntézu mykolových kyselin. Jeho IC_{50} dosahuje hodnoty $0.2 \mu\text{M}$ vůči enoyl-ACP-reduktázám bakterií.(FabA). Ukázalo se však, že se triklosan vůči MBT InhA chová jako extrémně rychle reverzibilní inhibitor. Inhibiční schopnost triklosanu vůči InhA je nižší ve srovnání s FabA (EC 4.2.1.59). To značně limituje jeho účinnost vůči MBT. Využití triklosanu *in vivo* dále limituje jeho velmi nízká biodostupnost.

I přesto je triklosan předmětem studií na jiné bakterie například *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus anthracis* či *Staphylococcus aureus*. [23]

2.6.1.2. Difenyl ethery



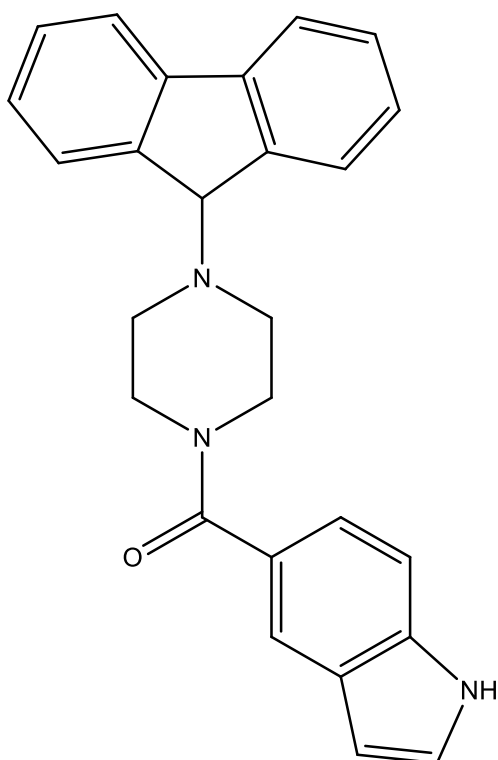
Obr. 14 Obecný vzorec difenyl etheru

Chemicky jsou tyto struktury odvozeny od molekuly triklosanu. Jedná se taktéž o difenyl ethery a obsahují hydroxylovou skupinu na A kruhu cyklu. Hydroxylová skupina se ukázala jako velice důležitá v procesu inhibice, a proto byla zachována.

První generace těchto sloučenin byla zaměřena na zvýšení účinnosti vůči InhA. Z této generace stojí za zmínku 5-oktyl-2-fenoxyfenol, který dosahoval hodnoty IC_{50} 5 nM [24]. Navíc tyto sloučeniny vykazují schopnost obcházet mechanismus rezistence na triklosan. Rezistence na triklosan spočívá pravděpodobně v zvýšení činnosti efluxních pump a aromatické deoxygenázy [25]. Přestože sloučenina vykazuje lepší hodnoty IC_{50} a je také méně cytotoxická než triklosan, její použití je zatím limitováno její nízkou biodostupností.

Proto se další studie zabývaly zvýšením biodostupnosti molekul. Hlavní strukturní změnou byla záměna kruhu B za dusíkatý heterocyklus. Druhým typem změny byla substituce na kruhu B skupinami nitro, amino, piperazino a substituovanou karbonylovou skupinou do poloh *ortho*, *meta* a *para*. Těmito úpravami se podařilo připravit několik molekul, které vykazovaly lepší biodostupnost, ovšem jejich účinnost se podstatně snížila.[24]

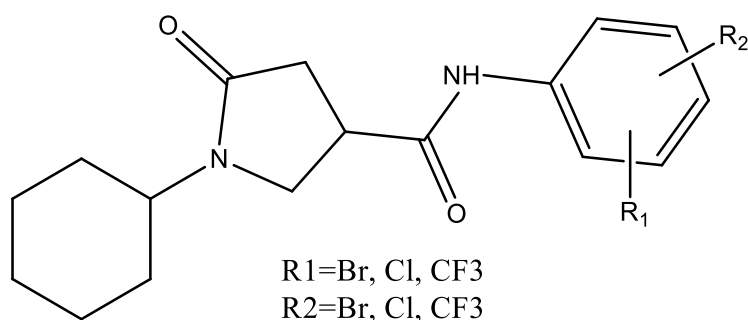
2.6.1.3. Indol-5-amidy



Obr. 15 Chemická struktura indol-5-amidu označeného jako genz 10850

Zde se chemicky jedná o 5-[4-(9H-fluoren-9-yl)piperazin-1-karbonyl]-1H-indol. Tyto molekuly byly nalezeny pomocí virtuálního screeningu. Přestože se svojí strukturou liší od triklosanu, mechanismus vazby do aktivního místa InhA mají stejný. *In vitro* testováním byla u této molekuly zjištěna IC_{50} proti InhA $0.16 \mu M$ [26].

2.6.1.4. Pyrrolidin karboxamidy



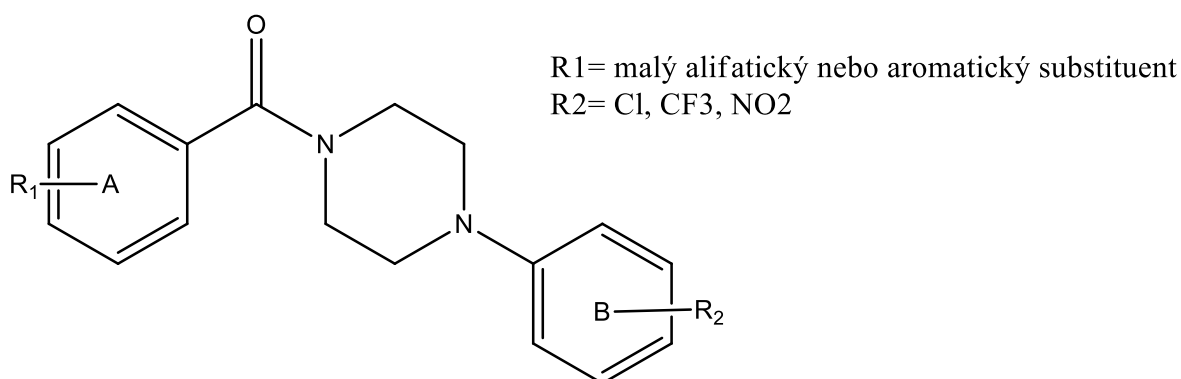
Obr. 16 Obecný vzorec pyrrolidin karboxamidů

Po provedení screeningu vazebných, inhibičních nebo biologických aktivit (high throughput screening, HTS) v roce 2006 bylo zjištěno, že pyrrolidin karboxamidy vykazují schopnost přímo inhibovat InhA. Dalším testováním byla upravena jejich

struktura a výsledné sloučeniny vykazují značně nízké hodnoty IC_{50} . Konkrétně pro sloučeninu na obrázku se IC_{50} proti InhA rovná $0.39 \mu M$.

Problémem u těchto sloučenin je zřejmě jejich fyzikálně-chemický profil neboť díky své struktuře špatně pronikají buněčnými membránami [27].

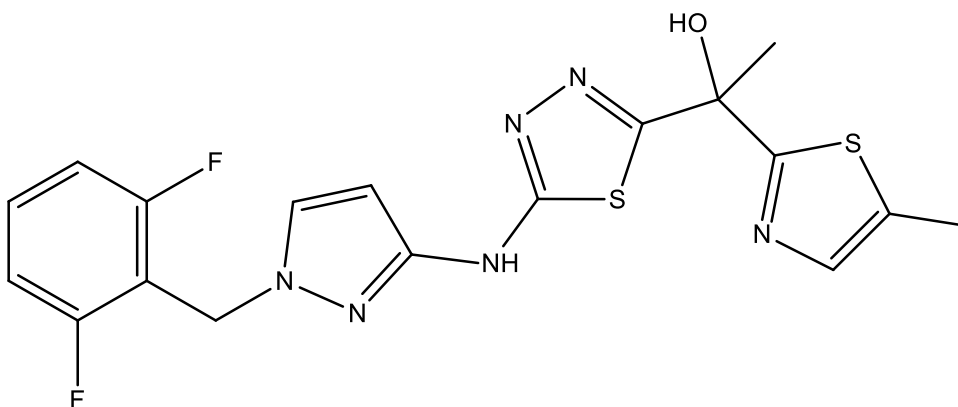
2.6.1.5. Arylamidy



Obr. 17 Obecný vzorec arylamidů

Arylamidy jako inhibitory InhA byly objeveny v roce 2007. Stejně jako o rok dříve pyrrolidin karboxamidy byly objeveny při HTS. Struktura, kde $R_1 = CH_3$ $R_2 = Cl$ vykazuje hodnotu $IC_{50} 3 \mu M$ [28].

2.6.1.6. Methyl-thiazoly



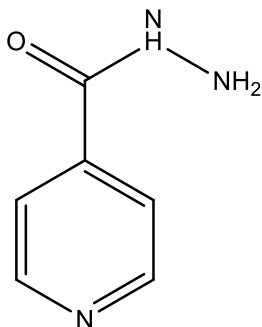
Obr. 18 Hlavní struktura methyl-thiazolů

Tato skupina byla objevena a publikována v literatuře v roce 2013. Přesný mechanismus vazby do aktivního místa InhA zůstává neznámý. Zvláštnost vazby do aktivního místa byla popsána v kapitole 2.6.1. Vzhledem ke skutečnosti, že tato skupina, na rozdíl od předchozích skupin, neobsahuje elektronegativní substituent, který u

předešlých skupin tvoří důležitou vazbu s Tyr158, mají tyto molekuly neutrální náboj, což výrazně přispívá k jejich lepší farmakokinetice [22].

2.6.2. Nepřímé inhibitory

2.6.2.1. Isoniazid

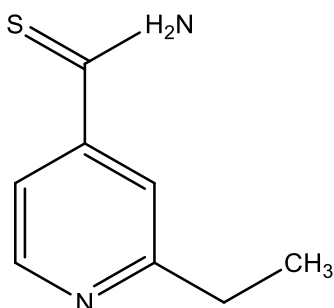


Obr. 19 Isoniazid

Chemicky se jedná o 2-ethylpyridin-4-karbothioamid. Strukturně patří do skupiny pyridinkarboxylových kyselin. Je stále ještě antituberkulotikum první linie i první volby.

Mechanismus inhibice isoniazidem je nepřímý. Po aktivaci za pomoci mykobakteriální katalázy KatG (EC 1.11.1.21) vzniká adukt s NADH. Tento adukt poté slouží jako inhibitor InhA. Tento mezikrok, kdy se tvoří adukt, je místem kde vzniká rezistence proti isoniazidu. Gen, jenž je zodpovědný za tvorbu enzymu KatG totiž rychle mutuje a adaptuje se na změny, které isoniazid způsobuje. Takto zmutovaný gen má nižší schopnost aktivace isoniazidu. Přímé inhibitory jsou proto slibnou alternativou tomuto léčivu.

2.6.2.2. Ethionamid



Obr. 20 Ethionamid

Chemicky 2-ethylpyridin-4-karbothioamid. Strukturně patří do skupiny pyridinu. Mechanismus účinku je obdobný jako u isoniazidu. Na rozdíl od isoniazidu

však není ethionamid aktivován pomocí enzymu KatG, ale jeho aktivaci zabezpečuje enzym EthA (EC:1.14.13), což je flavin dependentní monooxydáza [19].

2.7. Počítačová chemie

Jedná se relativně nový směr chemického výzkumu. Jeho počátky se datují od počátku 60. let 20. století. Hlavním aspektem tohoto směru je nahrazení klasického chemického experimentu počítačovou simulací. K tomuto účelu byla vyvinuta celou řadu softwarových nástrojů. Výhodou tohoto směru je možnost testovat chování velice složitých systémů, které by se nedalo zjistit klasickým experimentem. Pomocí počítačového softwaru se navíc dají nasimulovat i extrémní podmínky, kterých se nedá dosáhnout v laboratořích [29][30].

Společně s pojmem počítačová chemie se vyskytuje i pojem molekulové modelování. Molekulové modelování je generování, manipulace a/nebo reprezentace realistických molekulových struktur a příslušných fyzikálně chemických vlastností, kombinovaná s počítačovou grafikou [29].

2.7.1. Virtuální screening

Stálá potřeba vývoje nových farmakologicky aktivních látek je zřejmá. V oblasti antituberkulotik je navíc umocněna skutečností, že v dnešní době registrujeme stále více multi rezistentních, extrémně rezistentních a dokonce kompletně rezistentních kmenů MBT. Kompletně rezistentní kmeny nereagují na žádné z dosud známých antituberkulotik. Hlavní důvod zvýšeného počtu těchto kmenů je špatné složení a délka léčebných režimů [19].

Vývoj nových látek je velmi časově a hlavně finančně náročný proces. Dodnes se stále ještě používá metoda HTS. Tato metoda spočívá v robotizované testování vazebných, inhibičních nebo biologických aktivit látek. Problémem HTS je, že je zapotřebí velké množství látek, které je ne vždy snadné sehnat a připravit tak, aby se s nimi dalo dále pracovat. Taktéž metoda vykazuje velké množství falešně pozitivních a falešně negativních výsledků. V neposlední řadě jde o velmi drahou metodu, kdy jeden screening může stát od 100000 do 1000000 dolarů [31] [32].

V dnešní době je již do běžné praxe zavedena alternativa k HTS. Tou je metoda virtuálního screeningu (VS). Tuto metodu můžeme zařadit mezi *in silico* metody, neboť samotné testování probíhá pouze za pomoci výpočetní techniky a speciálního softwaru

k tomuto účelu navrženému. Výhodou této metody je bezesporu vysoká rychlost a nízká cena. Problémem VS je fakt, že poskytuje řadu falešně pozitivních i falešně negativních výsledků [31]. VS také klade nemalé nároky na své uživatele. Uživatel musí být plně obeznámen s funkcemi a vlastnostmi programů pro VS. Je to právě uživatel, který definuje některé vlastnosti, díky kterým jsou pak sloučeniny označeny jako vyhovující, nebo naopak vyřazeny z dalšího testování pro nesplnění zadaných vlastností [33]. Podrobněji je o metodách VS pojednáváno v další kapitole.

2.7.1.1. Vybrané metody VS

2.7.1.1.1. Farmakofor

Tato metoda je založena na předpokladu, že se podobná geometrická struktura rovná podobné biologické aktivitě. Na základě studia známých ligandů s popsáním účinkem se stanoví jeho farmakoforové vlastnosti. Mezi tyto vlastnosti řadíme donory a akceptory vodíkových vazeb, lipofilní skupiny, rozložení náboje a jiné. Tyto vlastnosti se zjišťují na základě znalosti ligandů. Po zjištění těchto vlastností se za pomoci programu pro VS nastaví požadované vlastnosti. Vytvoří se „filtr“, na základě kterého jsou v databázi látek nalezeny ty, které splňují zadané vlastnosti a jsou tedy vhodné pro další testování. Z toho vyplývá, že farmakofor je pouze geometrické schéma, jaké musí molekula splnit, aby dosáhla požadovaného farmakologického účinku [34].

2.7.1.1.2. Docking

Je velice rozšířená metoda založena na predikci způsobu vzájemné interakce makromolekuly, nejčastěji enzymu, vůči jiné molekule. Nejčastěji se zkoumá interakce s malými molekulami neboli ligandy. Těmi mohou být například malé molekuly, nukleové kyseliny, ale i jiné enzymy. Místem interakce bývá aktivní místo enzymu. Aktivní místo se skládá ze AMK zbytků uspořádaných v prostoru, které interagují s dockovaným ligandem [35].

Celý proces by se dal zjednodušit příkladem „zámku a klíče“, kdy ligand „klíč“ přesně „zapadne“ do definované pozice aktivního místa enzymu „zámku“. Problémem této teorie je předpoklad neměnicích se parametrů ligandu ani aktivního místa. Proto byla nahrazena teorií „ruky v rukavici“, která přesněji popisuje vznikající interakci. Tato teorie předpokládá, že se aktivní místo i samotný ligand do jisté míry navzájem přizpůsobí pomocí malých konformačních změn tak, aby mezi nimi vznikla stabilní a nejméně energeticky náročná vazba.

Proces dockingu se skládá ze dvou hlavních kroků, které jsou navzájem propojené. V prvním kroku se snažíme nalézt pózy, při kterých se vytvoří stabilní komplex ligand receptor, a které jsou navíc nejvíce energeticky výhodné. Ve druhém kroku je programem spočítána vazebná energie všech komplexů ligand-receptor a těmto komplexům je přiřazena hodnota vazebné energie. Komplex získá určité „skóre“. Mluvíme tedy o scoring function, což je empirická závislost volné energie interakce protein-ligand na konformaci jejich komplexu [36] [31].

3. Experimentální část

3.1. Příprava enzymů

Z internetové databáze Protein Data Bank (pdb.org) byly staženy krystalografické struktury enzymů. Jednalo se o struktury 1P44 [26], 2X23[24] a 4TZK [27]. Tyto struktury nejlépe vyhovovaly našim požadavkům na různorodost. Ve struktuře 1P44 bylo vazebné místo pro substrát plně otevřeno. 4TZK představovalo vazebné místo polootevřené a 2X23 vazebné místo uzavřené. Tuto skutečnost můžeme vidět na **Obr. 21**. Další z důvodů pro vybrání těchto struktur byl fakt, že se na nich již testovala a prokázala účinnost jiných přímých inhibitorů InhA. Vazebné místo pro substrát je v těchto krystalografických strukturách kompletně krystalograficky popsáno, což je důležité pro další práci v dockovacím programu.



Obr. 21 Barevně odlišené krystalografické struktury InhA s rozdílným vazebným místem pro substrát (horní část)

Pomocí programu Maestro 9.9.013 a jeho funkce PrepWizard byly nalezeny a odstraněny přebytečné podjednotky. Dále byly ze struktury podjednotky odstraněny ty

molekuly vody, které se přímo nepodílejí na stabilizaci struktury nebo kofaktoru NADH.

Následně byla provedena minimalizace struktury pomocí programu MOE (Molecular Operating Environment). Nastavení minimalizace bylo: Input data: all atoms, Forcefield: Amber10, Constrains: Fixed watter molecules; Gradient: 0.001 RMS kcal/mol/Å²; Optimally oriented OH groups.

3.2. Příprava ligandů

Z internetové stránky zinc.docking.org byla pro potřeby diplomové práce vybrána a stažena databáze chemických látek označená jako Znd (Zinc Natural Derivates). V této databázi můžeme nalézt 30793 sloučenin. Jedná se o deriváty přírodních látek, které je možné komerčně zakoupit [37].

V programu MOE byla celá databáze látek upravena pomocí funkce WASH. Touto funkcí byly deprotonovány silné kyseliny, protonovány silné baze, poupraveny úhly molekul ligandů, doplněny chybějící vazby a přiřazeny parciální náboje, tak aby se s nimi mohlo dále pracovat.

3.3. Docking v programu MOE

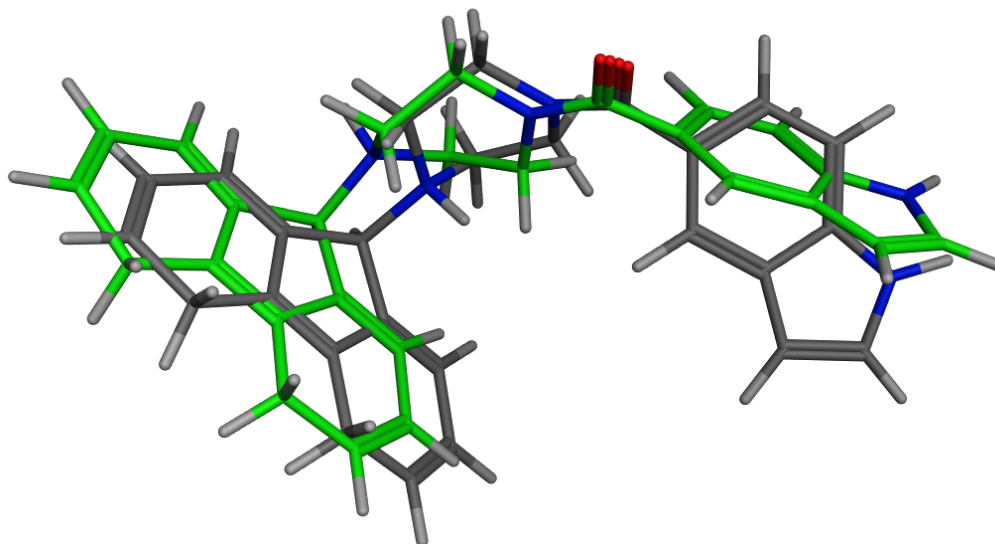
Pomocí funkce Site Finder bylo nalezeno aktivní místo proteinu. Aktivní místo bylo identifikováno podle přítomnosti kofaktoru NADH a klíčových residuí jako Tyr 158 a Lys 165. Funkce Site Finder umístí do kavity tzv. dummy atoms, které později slouží pro vytvoření 3D mapy aktivního místa, kde probíhá samotné dockování.

3.3.1. Redocking

V krystalografických strukturách byly v aktivním místě enzymů nalezeny molekuly původních ligandů. Následně byly tyto ligandy opětovně zadockovány (redockovány) na své původní místo. Tímto procesem byla ověřována vhodnost programu MOE pro potřeby diplomové práce. Zároveň se hledalo takové nastavení dockovací funkce, aby se póza ligandu v aktivním místě nejvíce shodovala s původní pózou v krystalografické struktuře. Jedním z výstupů byla taky hodnota vazebné energie, kterou dockovací program přiřadil původnímu ligandu. Při redockingu byl receptor nastaven jako rigid receptor.

3.3.1.1. 1P44

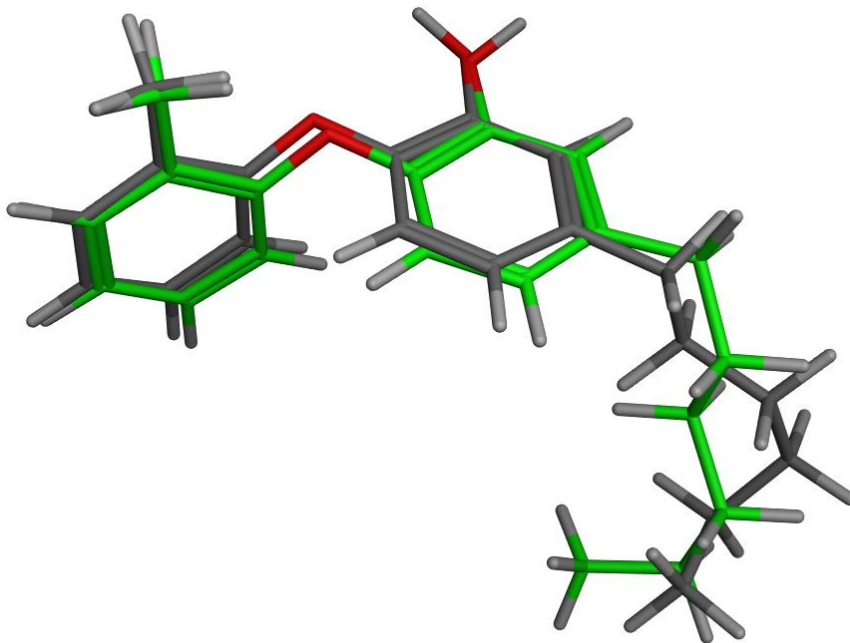
V krystalografické struktuře tohoto enzymu se nacházela molekula přímého inhibitoru Genz 10850. Tato molekula patří do skupiny indolil-5-amidů (kapitola 2.6.1.3). Redockingem se zjistila hodnota vazebné energie - **8,1161 (kcal/mol)**.



Obr. 22 Molekula Genz 10850 a její redockovaná póza (zeleně) ve struktuře 1P44.

3.3.1.2. 2X23

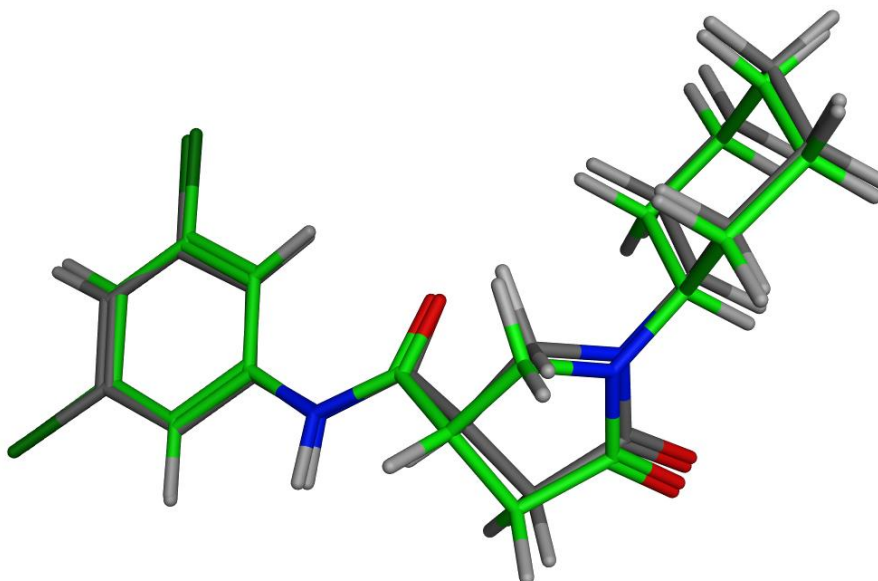
V krystalografické struktuře enzymu InhA označeného 2X23 se nacházela molekula označená jako PT70. Tato molekula patří do skupiny přímých inhibitorů, difenyl etherů (kapitola 2.6.1.2). Hodnota vazebné energie této sloučeniny byla - **9,315 (kcal/mol)**.



Obr. 23 Molekula označená PT70 a její redockovaná póza (zeleně) ve struktuře 2X23

3.3.1.3. 4TZK

V krystalografické struktuře enzymu InhA označeného 4TZK se nacházela molekula patřící do skupiny přímých inhibitorů pyrrolidin karboxamidů (kapitola 2.6.1.4). Přesněji molekula s dichlor substitucí na aromatické části molekuly. Zde byla hodnota vazebné energie – **8,0123 (kcal/mol)**.



Obr. 24 Struktura inhibitoru a její redockovaná póza (zeleně) ve struktuře 4TZK

3.3.1.4. Výsledné nastavení

Pro každou ze tří krystalografických struktur bylo v programu MOE testováno několik nastavení parametrů pro docking. Naším cílem bylo najít takové nastavení, při kterém by se póza v krystalografické struktuře a redockovaná póza nejvíce shodovaly.

Pro všechny 3 struktury bylo nakonec vybráno nastavení parametrů: **placement-alpha PMI, první re-scoring-affinity dG, refinement-Forcefield a druhý re-scoring-affinity dG.**

Tato konfigurace nejvíce vyhovovala potřebám experimentů prováděných v této práci. U všech struktur enzymu při tomto nastavení parametrů byly mechanismy vazby v aktivním místě InhA stejné. Dále pak pózy nejlépe skórovaných molekul byly podobné s pózami molekul, které se nacházely původně v krystalografických strukturách (**Obr. 22; Obr. 23; Obr. 24**). Zároveň hodnoty vazebné energie pro tyto redockované pózy byly nejnižší (nejvýhodnější konformace) pro 1P44. - **8,1161 (kcal/mol)**. Pro 2X23 - **0,9315 (kcal/mol)**. Pro 4TZK – **8,0123 (kcal/mol)**. Z tohoto důvodu byla tato konfigurace vybrána jako nejvhodnější pro další fázi testování.

3.3.2. Screening databáze pomocí dockingu

Pro screening v naší zvolené databázi (popsané v kapitole 3.2) byly nastaveny v dockovací funkci programu MOE parametry, které byly nalezeny při redockingu původních ligandů. Vlastnost receptoru byla zvolena jako rigid receptor. Dockovací sekvence byla spuštěna pro každou krystalografickou strukturu zvlášť. Cílem bylo nalézt sloučeniny s velkou pravděpodobností vazby do molekuly InhA.

Tato fáze testování byla nejvíce časově náročná, protože se pracovalo s celou databází tedy s 30 793 sloučeninami. Sekvence pro jednu krystalografickou strukturu enzymu trvala vždy přibližně 36 hod.

Výsledkem byl soubor formátu mdb, který obsahoval hodnoty vazebné energie pro jednotlivé sloučeniny. Zároveň soubor obsahoval i pózy, do kterých byly sloučeniny zadockovány.

Celkem tedy byly výsledkem této fáze testování 3 soubory, pro každou krystalografickou strukturu jeden. Z každého souboru byly vybrány sloučeniny, jejichž nejlépe ohodnocená póza měla nižší nebo přibližně stejnou hodnotu vazebné energie

jako původní ligand. Jako referenční hodnota vazebné energie pro sloučeniny byla zvolena hodnota, která byla zjištěná při redockingu.

Na základě kritérií, popsaných v předchozím odstavci, bylo z krystalografické struktury enzymu označené 1P44 vybráno 99 sloučenin. Ze struktury 2X23 to bylo 61 sloučenin a ze struktury 4TZK 96 sloučenin.

3.3.3. Farmakofor

Po prostudování chemické struktury dosud známých přímých inhibitorů InhA a po identifikaci společných vazebných znaků byly definovány vlastnosti farmakoforu. Pomocí programu MOE byly nastaveny parametry, které sloučenina musela splňovat. Sloučenina musela obsahovat elektronegativní skupinu, která tvořila vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou Tyr 158. Ve sloučenině se musel nacházet nenasycený nebo aromatický systém, který by tvořil π - π interakci s pyridinem molekuly NADH.

Z těchto vlastností farmakoforu byl vytvořen filtr, a ten byl použit pro screening v databázi nejlépe ohodnocených sloučenin z předchozího testování. Pro dockovací sekvenci byly nastaveny parametry dockovací funkce shodné s těmi z kapitoly 3.3.1.4.

Výsledkem byly 3 soubory, pro každou struktura jeden. V těchto souborech se dohromady vyskytovalo celkem 22 sloučenin. Těchto 22 sloučenin bylo sloučeno z těchto 3 souborů do 1 souboru a ten byl využit v poslední fázi testování.

3.3.4. Induced fit

V poslední fázi testování bylo nejdříve opět hledáno optimální nastavení parametrů. Pro každou krystalografickou strukturu enzymu byla znovu provedena série testů, při níž se hledalo optimální nastavení tak, aby se póza nově zadockovaná co nejvíce přiblížila originální póze ligandu. Testování probíhalo s původním ligandem. Rozdíl oproti redockingu byl v nastavení receptoru. Ten byl nastaven na induced fit.

Jako výsledné nastavení parametrů pro všechny 3 krystalografické struktury enzymu bylo nakonec vybráno nastavení parametrů: **placement-alpha P_{Mi}, první re-scoring-affinity dG, refinement-Forcefield a druhý re-scoring-affinity dG.**

Výsledkem byly 3 soubory formátu.mdb pro každou krystalografickou strukturu jeden. Každý soubor obsahoval pózy a vazebné energie sloučenin, které prošly až do poslední fáze testování. V těchto souborech byly vyhledány především takové

sloučeniny, které dosahovaly nízkých hodnot vazebných energií a zároveň se jejich zadockovaná póza ve všech třech krystalografických strukturách shodovala nebo vykazovala společné vazebné znaky.

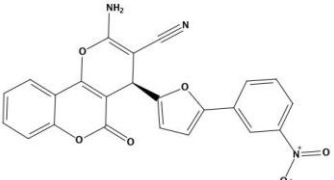
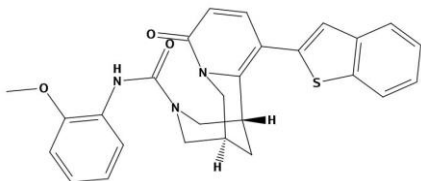
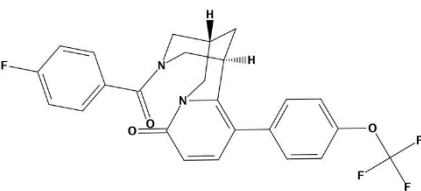
4. Výsledky a diskuze

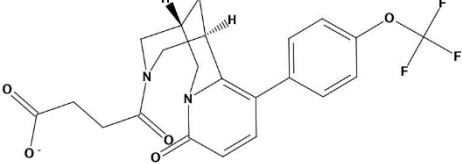
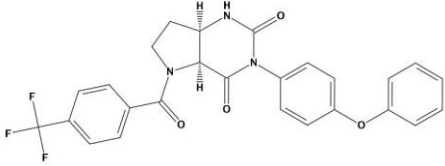
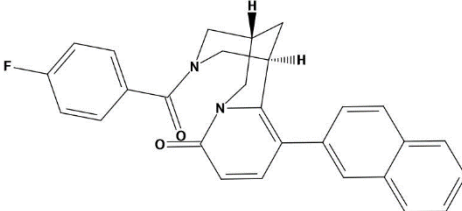
Celkem 22 sloučenin (Tabulka 1) z původních 30793 nacházejících se ve zvolené databázi Znd, bylo vybráno pro závěrečnou fázi testování. Z těchto 22 sloučenin bylo vybráno 8, jejichž vypočítaná vazebná energie byla nejnižší ze všech testovaných sloučenin nebo jejichž pózy vykazovaly stejné vazebné znaky. Tyto sloučeniny jsou v tabulce 1 zvýrazněny.

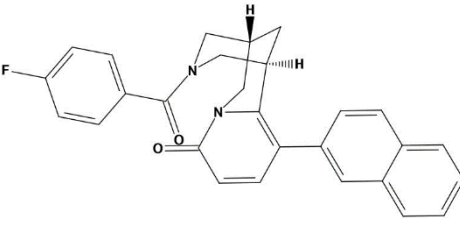
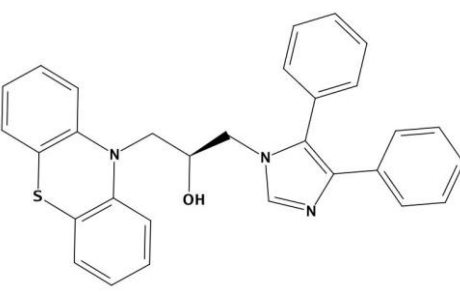
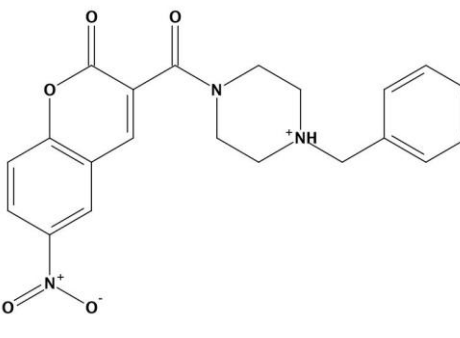
Tabulka 1 Hodnoty vazebných energií pro nejlépe ohodnocené pózy ve všech 3 krystalografických strukturách. Sloučeniny jsou řazeny, sestupně podle svého ZINC čísla.

Zinc kód	Číslo molekuly	Vazebná energie 1P44	Vazebná energie 2X23	Vazebná energie 4TZK
zinc00032933	1	-8.6558781	-11.497742	-11.200068
zinc00755555	2	-8.6944504	-10.018429	-9.8107147
zinc01073616	3	-8.2370157	-10.786482	-9.2852688
zinc01107285	4	-9.7218485	-12.588638	-11.607449
zinc03839474	5	-7.2703543	-8.4873142	-8.9595804
zinc03839475	6	-8.6198816	-10.203152	-9.150341
zinc03839512	7	-9.0721455	-9.4179497	-9.8202934
zinc04237394	8	-9.5762186	-10.931234	-11.440536
zinc04237420	9	-9.7091856	-10.894766	-10.886354
zinc04237438	10	-11.263044	-11.979378	-11.895625
zinc04237445	11	-9.7867517	-11.250748	-12.019165
zinc04259684	12	-9.3393307	-11.781843	-10.65886
zinc04278035	13	-10.993459	-12.024328	-11.843314
zinc05410626	14	-9.5545731	-10.01357	-10.536249
zinc05415069	15	-10.987124	-12.189705	-11.959829
zinc08297925	16	-9.5238314	-10.632463	-10.638325
zinc08643197	17	-10.592021	-11.892423	-11.913735
zinc19372079	18	-10.631567	-9.5172281	-11.075039
zinc20503201	19	-9.5172195	-10.154373	-10.636997
zinc35442523	20	-8.1041088	-9.4675665	-9.1625938
zinc49169886	21	-7.9600344	-8.5416384	-8.6100454
zinc67890431	22	-8.5914774	-10.183677	-9.4137354

V Tabulka 2 je vybraných 8 sloučenin. Najdeme zde vždy strukturní vzorec sloučeniny a název sloučeniny vytvořený pomocí IUPAC názvosloví. V tabulce dále nalezneme hodnoty potřebné pro určení, zda sloučenina vyhovuje lipinského pravidlu pěti. Všechny hodnoty v tabulce jsou změřeny při pH=7.

Strukturní vzorec	sloučenina 4 zinc01107285			
	Chemický název:			
	(4R)-2-amino-5-keto-4-[5-(3-nitrofenyl)-2-furyl]-4H-pyrano[3,2-c]chroman-3-karbonitril			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
3.83	2	9	427.372	
Strukturní vzorec	sloučenina 9 zinc04237420			
	Chemický název:			
	(1R,9S)-3-(1-benzothiofen-2-yl)-N-(2-methoxyphenyl)-6-oxo-7,11-diazatricyklo[7.3.1.0]trideka-2,4-dien-11-karboxamid			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
5.44	1	6	471.582	
Strukturní vzorec	sloučenina 10 zinc04237438			
	Chemický název:			
	(1R,9S)-11-(4-fluorobenzoyl)-3-[4-(trifluormethoxy)fenyl]-7,11-diazatricyklo[7.3.1.0]trideka-2,4-dien-6-on			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
4.69	0	5	472.438	

Strukturní vzorec	sloučenina 11 zinc04237445			
	Chemický název: 4-oxo-4-[(1R,9S)-6-oxo-3-[4-(trifluoromethoxy)fenyl]-7,11-diazatricyklo [7.3.1.0]trideka-2,4-dien-11-yl]butanová kyselina			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
	3.08	0	7	449.405
Strukturní vzorec	sloučenina 13 zinc04278035			
	Chemický název: 3-(4-fenoxyfenyl)-9-[4-(trifluormethyl)benzoyl]-3,5,9-triazabicyklo[4.3.0]nonan-2,4-dion			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
	4.22	1	7	495.457
Strukturní vzorec	sloučenina 15 zinc05415069			
	Chemický název: (1R,9S)-11-(4-fluorbenzoyl)-3-(naftalen-2-yl)-7,11-diazatricyklo [7.3.1.0]trideka-2,4-dien-6-on			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
	4.91	0	4	438.502

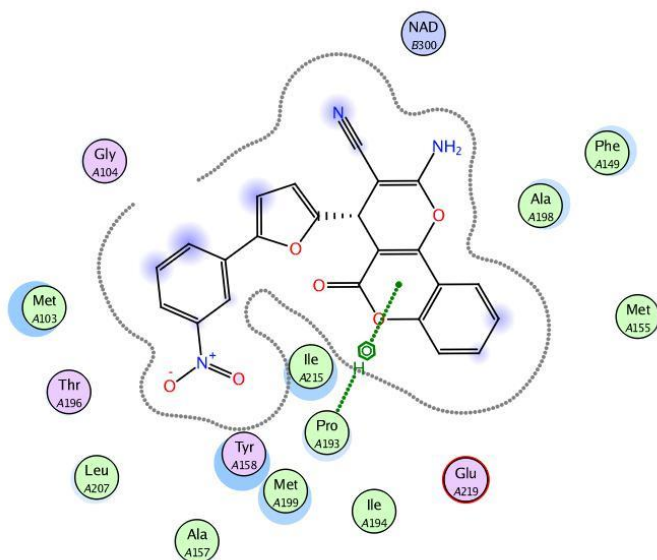
Strukturní vzorec	sloučenina 15 zinc05415069			
	Chemický název:			
	(1R,9S)-11-(4-fluorbenzoyl)-3-(naftalen-2-yl)-7,11-diazatricyklo [7.3.1.0]trideka-2,4-dien-6-on			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
4.91	0	4	438.502	
Strukturní vzorec	sloučenina 17 zinc08643197			
	Chemický název:			
	1-(4,5-difenyl-1H-imidazol-1-yl)-3-(10H-fenothiazin-10-yl)propan-2-ol			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
6.46	1	4	475.617	
Strukturní vzorec	sloučenina 18 zinc19372079			
	Chemický název:			
	3-(4-benzylpiperazin-1-karbonyl)-6-nitrochromen-2-on			
	logP	Donory H vazeb	Akceptory H vazeb	Molekulová hmotnost
2.13	0	8	393.399	

Tabulka 2

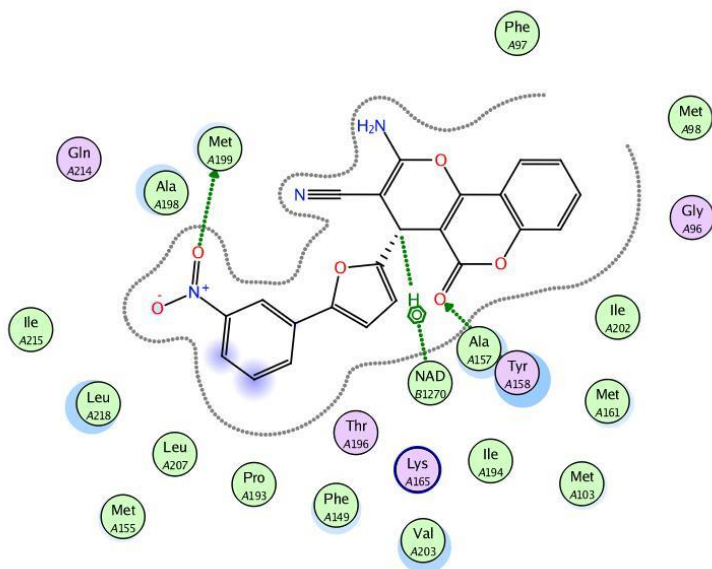
Následující 2D interakční diagramy **8** vybraných sloučenin byly vytvořeny v programu MOE. Zobrazují interakce vybraných sloučenin a jednotlivých krystalografických struktur enzymu InhA. Hodnoty vazebných energií interakcí, které se na diagramu zobrazily, byly nastaveny téměř pro všechny sloučeniny a struktury stejně a to na **- 0,5 kcal/mol** jak pro vodíkovou, tak pro iontovou vazbu. Výjimka pro toto nastavení byla provedena pro sloučeninu **4** ve struktuře 4TZK a sloučeniny **17** ve struktuře 1P44 protože při hodnotě **- 0,5 kcal/mol** nebyly znázorněny žádné interakce. Hodnota vazebné energie byla upravena pro oba diagramy na hodnotu **- 0,2 kcal/mol** jak pro vodíkovou tak iontovou vazbu.

V 3D vizualizacích jsou zobrazeny prostorové pózy pro jednotlivé krystalografické struktury. Sloučeniny byly barevně odlišeny podle toho, ze které krystalografické struktury pochází. Póza ze struktury 1P44 je zobrazena zeleně. Póza z 2X23 je zobrazena tyrkysově a pro pózu z krystalografické struktury 4TZK byla zvolena žlutá barva. V 3D diagramu dále nalezneme molekulu Tyr158 která má šedou barvu a molekulu NADH, která má výrazné fialově zbarvené atomy fosforu. Vodíkové vazby jsou v 3D vizualizacích znázorněny šedou přerušovanou čarou a π interakce jsou naznačeny přerušovanou čarou s jedním masivnějším válcem.

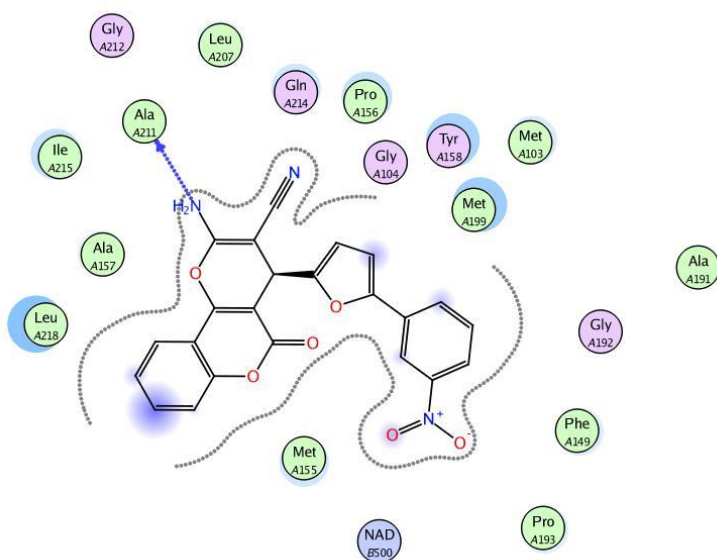
4.1. Sloučenina 4 Zinc01107285



Obr. 25 2D interakční diagram sloučeniny 4 a struktury 1P44



Obr. 26 2D interakční diagram sloučeniny 4 a struktury 2X23



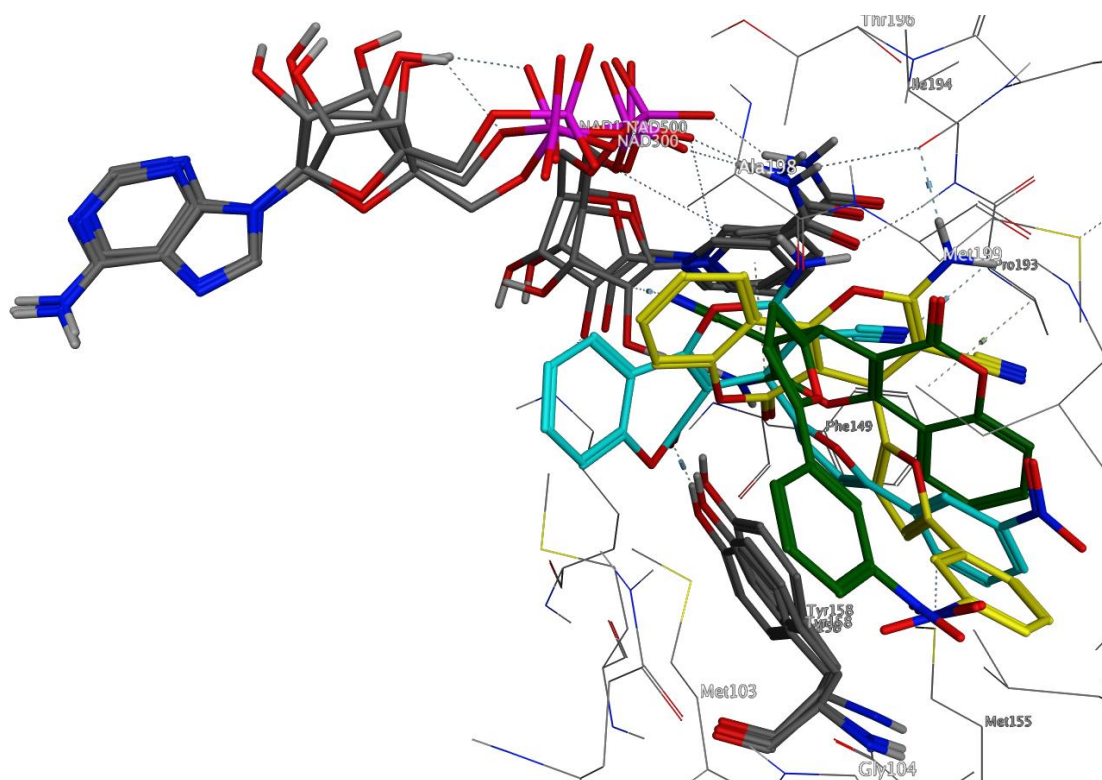
Obr. 27 2D interakční diagram sloučeniny 4 a struktury 4TZK

Hlavní důvod proč byla Sloučenina **4** vybrána pro další zkoumání je fakt, že ve struktuře 2X23 vykazovala nejnižší hodnotu vazebné energie - **12.59 kcal/mol**.

V 2D interakční diagramu krystalografické struktury 1P44 vidíme, že sloučenina tvoří π vazbu s Pro193. Ve struktuře 2X23 tvoří sloučenina π vazbu s molekulami

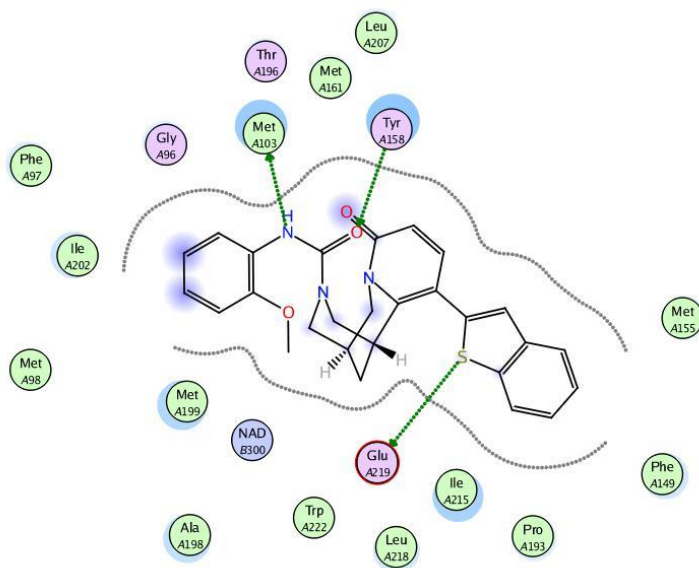
NADH a dále pak vodíkové vazby s Ala157 a Met199. Ve struktuře 4TZK vidíme vodíkovou vazbu s molekulou Ala213.

Výše uvedené 2D interakční diagramy sloučeniny **4** ukazují, že sloučenina netvoří interakce typické pro mechanismus inhibice InhA. Zaddockované pózy se v jednotlivých strukturách navíc neshodují ani v jednom případě, což je možné vysvětlit různou konformací vazebného místa. Viditelné na (Obr. 28). Z výše popsaného vyplývá, že tato sloučenina není vhodná pro další zkoumání.

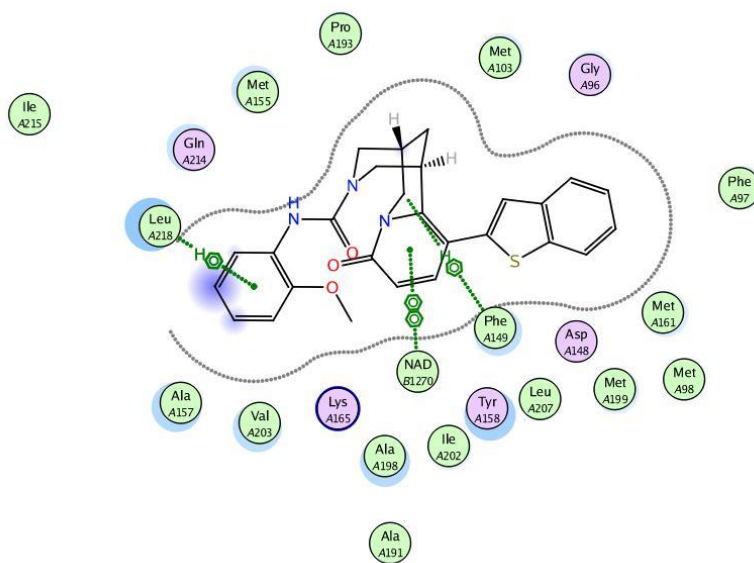


Obr. 28 3D vizualizace sloučeniny **4** zaddockované v aktivním místě InhA

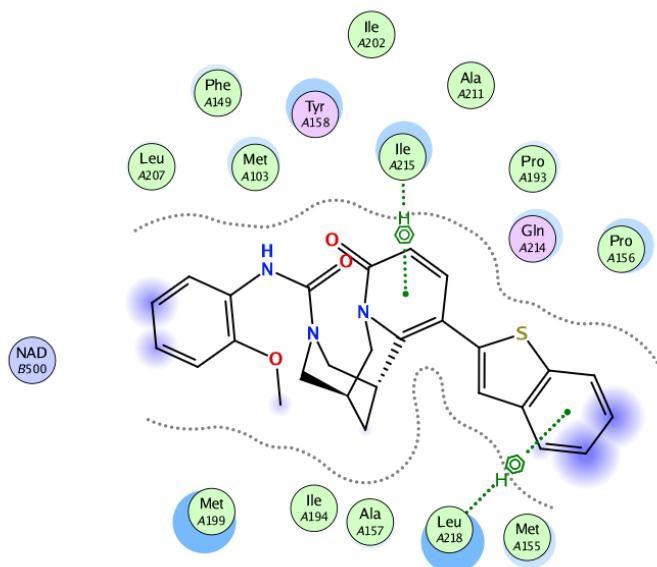
4.2. Sloučenina 9 Zinc04237420



Obr. 29 2D interakční diagram sloučeniny 9 a struktury 1P44



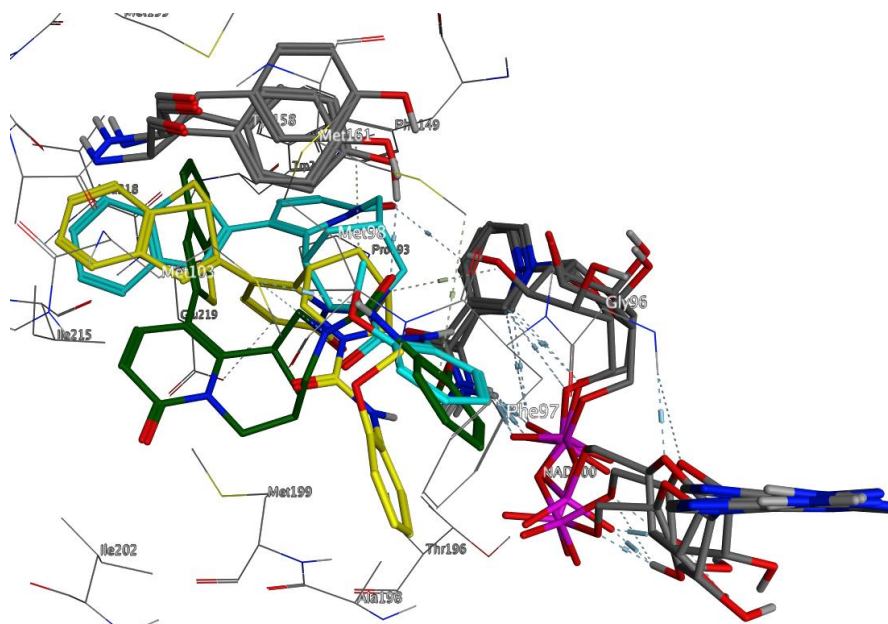
Obr. 30 2D interakční diagram sloučeniny 9 a struktury 2X23



Obr. 31 2D interakční diagram sloučeniny 9 a struktury 4TZK

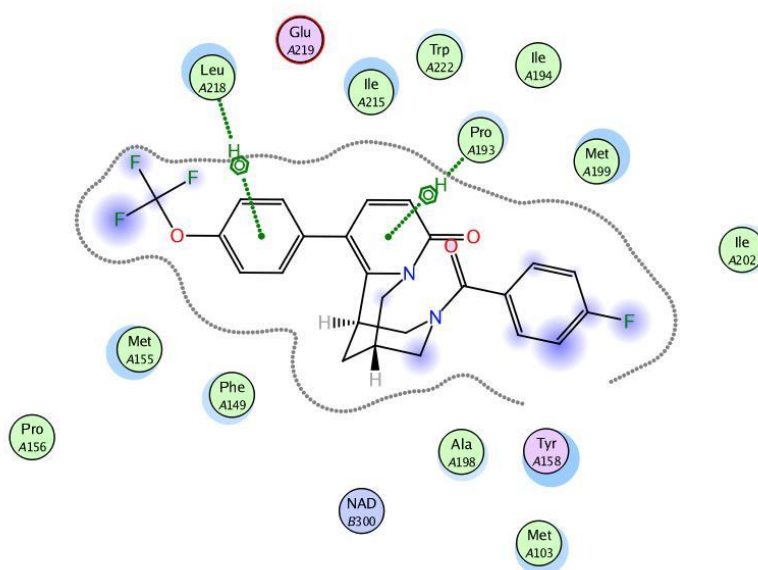
Na 2D interakčních diagramech sloučeniny 9 v krystalografických strukturách 1P44 a 2X23 můžeme nalézt takové interakce, typické pro inhibici InhA dosud známých přímých inhibitorů. Konkrétně vodíkovou vazbu s Tyr158 ve struktuře 1P44 a π - π vazbu s NADH ve struktuře 2X23. Kromě toho můžeme ještě ve struktuře 1P44 nalézt vodíkovou vazbu s Met103 a ve struktuře 2X23 π -H interakce s Leu218 a Phe149. Nalezneme zde slabou interakci π -H s Leu218 a Ile225.

Jednotlivé pózy nejeví známky podobnosti. Tuto skutečnost potvrzuje 3D vizualizace. V této vizualizaci můžeme vidět vodíkovou vazbu Tyr158 s oxo skupinou sloučeniny 9 ve struktuře 1P44 a také π - π s nikotinamidovým kruhem NADH.

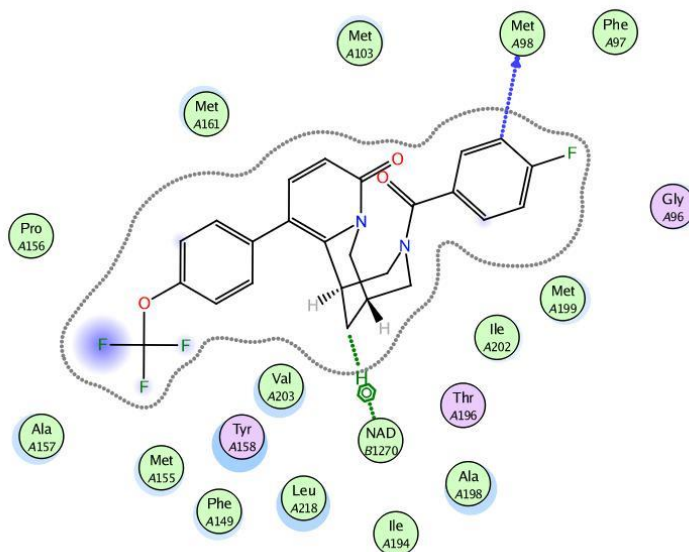


Obr. 32 3D vizualizace sloučeniny 9 zadockované v aktivním místě InhA

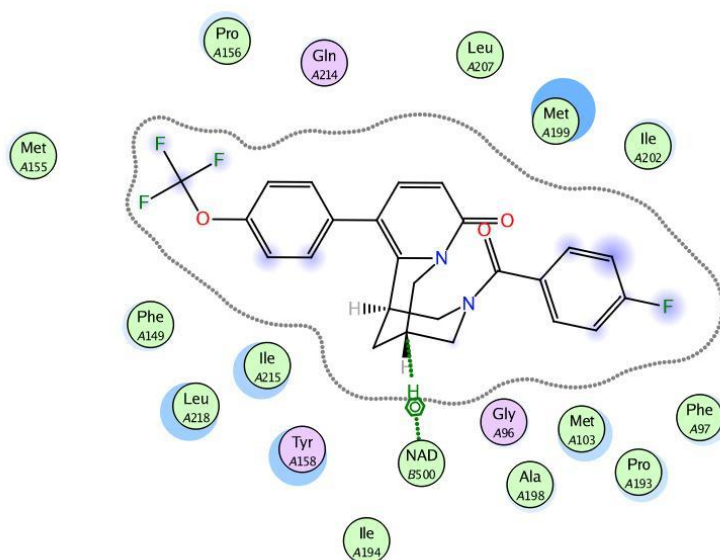
4.3. Sloučenina 10 Zinc04237438



Obr. 33 2D interakční diagram sloučeniny 10 a struktury 1P44



Obr. 34 2D interakční diagram sloučeniny 10 a struktury 2X23

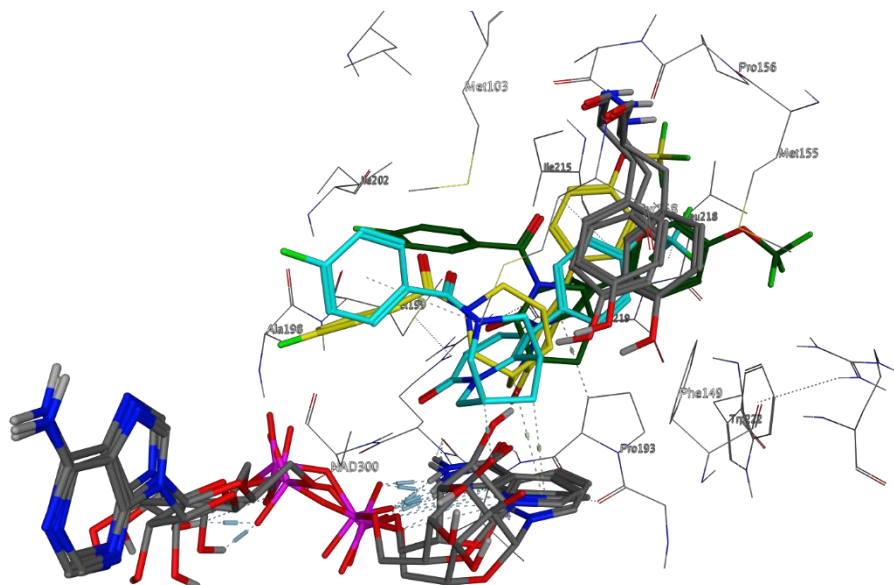


Obr. 35 2D interakční diagram sloučeniny 10 a struktury 4TZK

Hodnoty vazebných energií pro tuto sloučeninu byly ve všech krystalografických strukturách nízké. Konkrétně - **11.26 kcal/mol** ve struktuře 1P44, - **11.98 kcal/mol** pro 2X23 a - **11.90 kcal/mol** pro 4TZK.

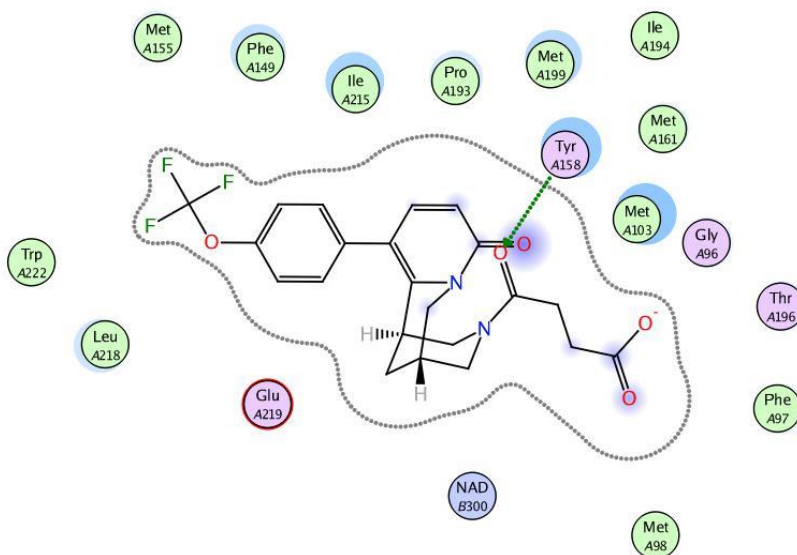
Avšak 2D diagramy naznačují, že sloučenina nevytváří typické interakce v aktivním místě InhA. Ve struktuře 1P44 tvoří sloučenina π -H interakce s Pro193 a Leu218. Ve struktuře 2X23 tvoří sloučenina π -H interakci s NADH, vodíkovou vazbu s Met98. Ve struktuře 4TZK nalezneme taktéž π -H interakci s NADH.

Na 3D vizualizaci vidíme podobnost póz, do kterých se sloučenina orinetuje ve strukturách 1P44 a 4TZK a taktéž odlišnost zadockované pózy ve struktuře 2X23, která je pravděpodobně způsobena užší formou domény aktivního místa

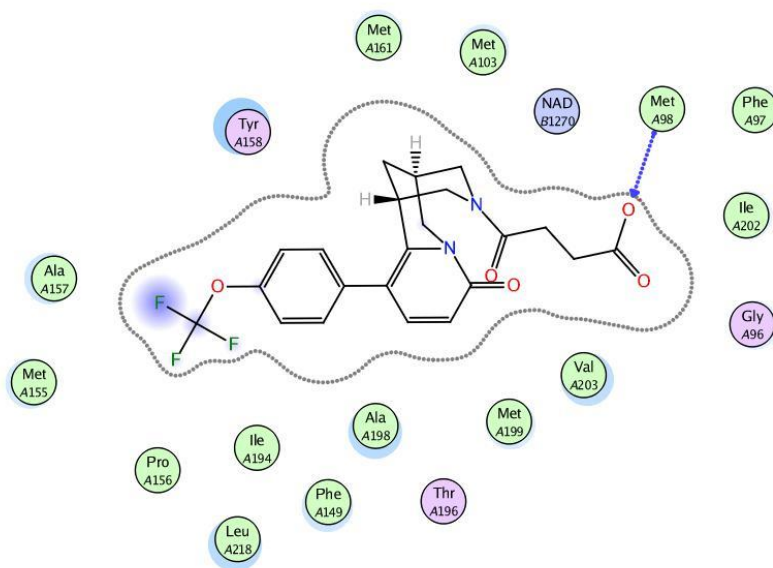


Obr. 36 3D vizualizace sloučeniny 10 zadockované v aktivním místě InhA

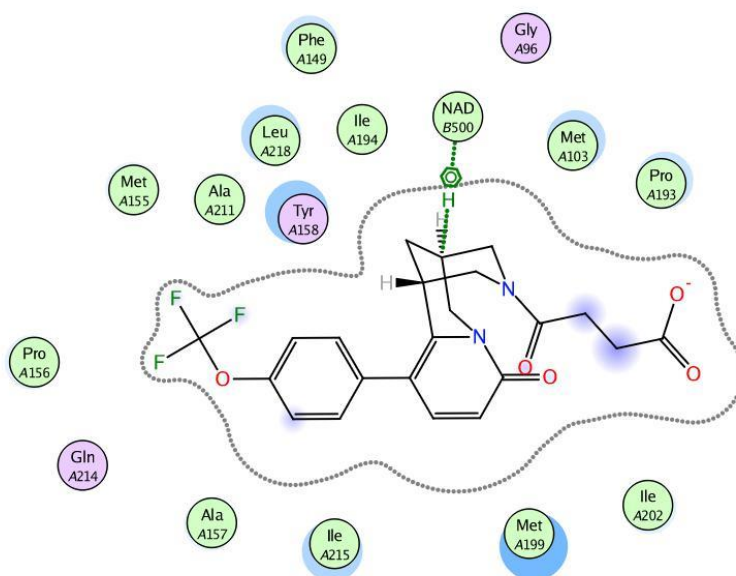
4.4. Sloučenina 11 Zinc04237445



Obr. 37 2D interakční diagram sloučeniny 11 a struktury 1P44



Obr. 38 2D interakční diagram sloučeniny 11 a struktury 2X23

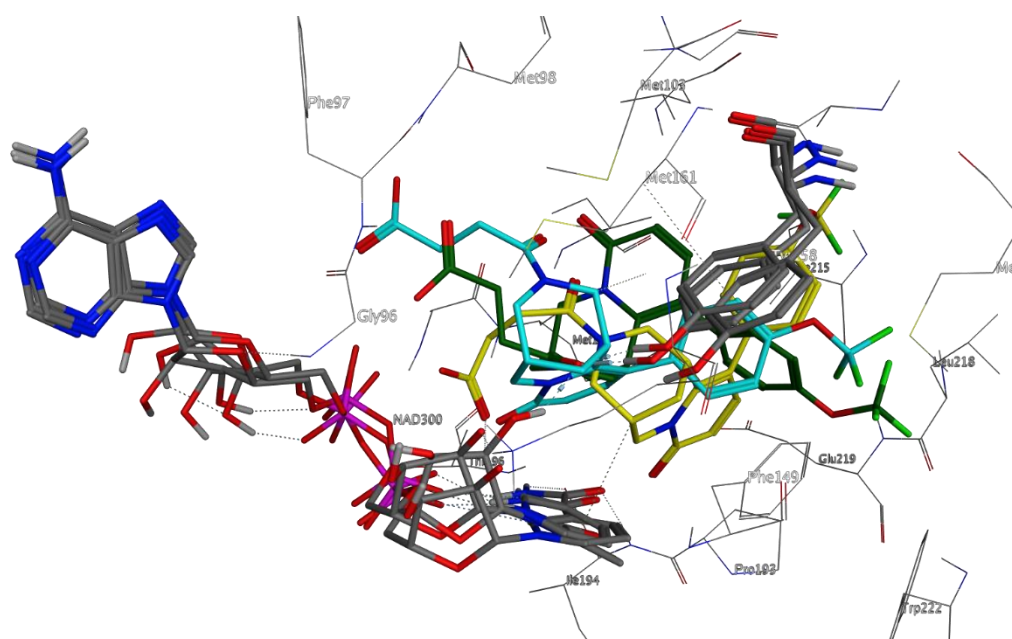


Obr. 39 2D interakční diagram sloučeniny 11 a struktury 4TZK

Sloučenina **11** vykazuje v krystalografické struktuře 4TZK hodnotu vazebné energie **-12.02 Kcal/mol**. Jedná se o nejnižší hodnotu vazebné energie všech 22 sloučenin, které byly zadockovány do struktury 4TZK.

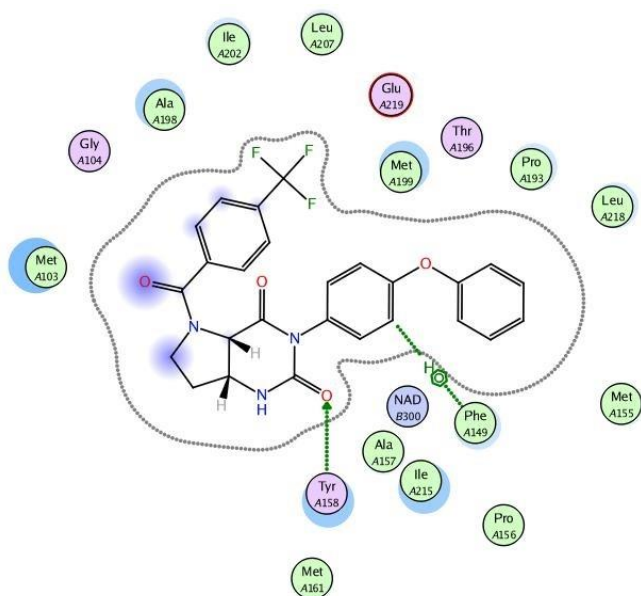
Ve struktuře 1P44 je na 2D diagram znázorněna vodíková vazba s Tyr 158. Ve struktuře 2X23 vytváří sloučenina důležitou vodíkovou vazbu s Met98. 2D diagram sloučeniny 4TZK znázorňuje π -H interakci s NADH.

Z 3D vizualizace je patrné, že interakce ve struktuře 4TZK vzniká s pyridinovým kruhem. Póza ve struktuře 1P44 obsahuje velmi důležitou vodíkovou vazbu na Tyr158.

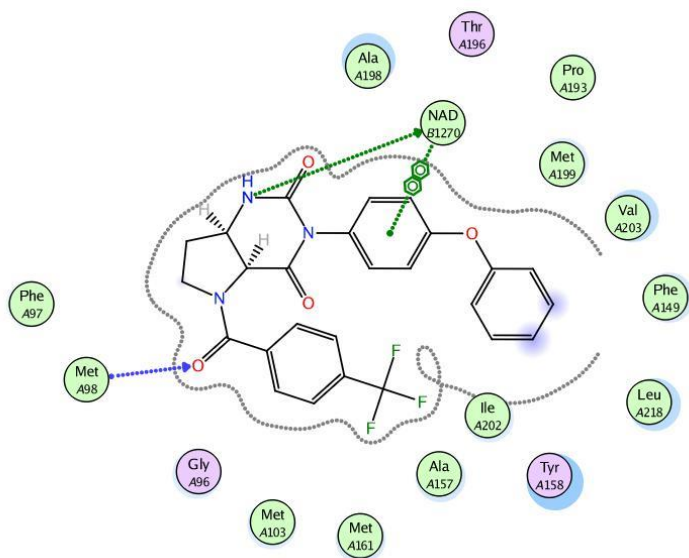


Obr. 40 3D vizualizace sloučeniny 11 zadočkováné v aktivním místě InhA

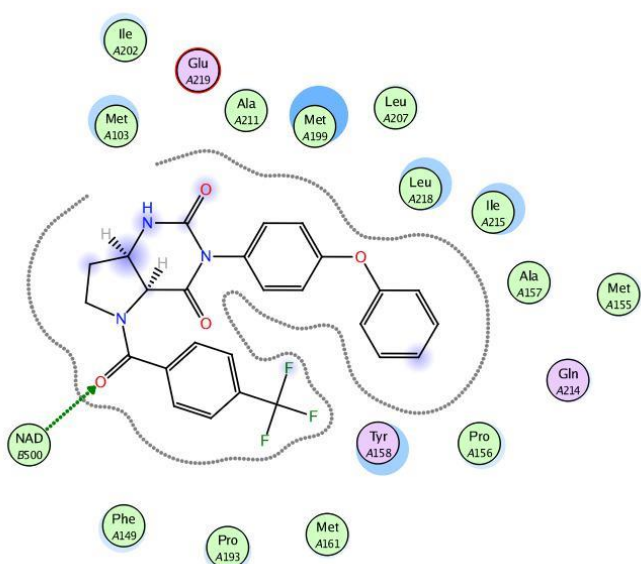
4.5. Sloučenina 13 Zinc04278035



Obr. 41 2D interakční diagram sloučeniny 13 a struktury 1P44



Obr. 42 2D interakční diagram sloučeniny 13 a struktury 2X23



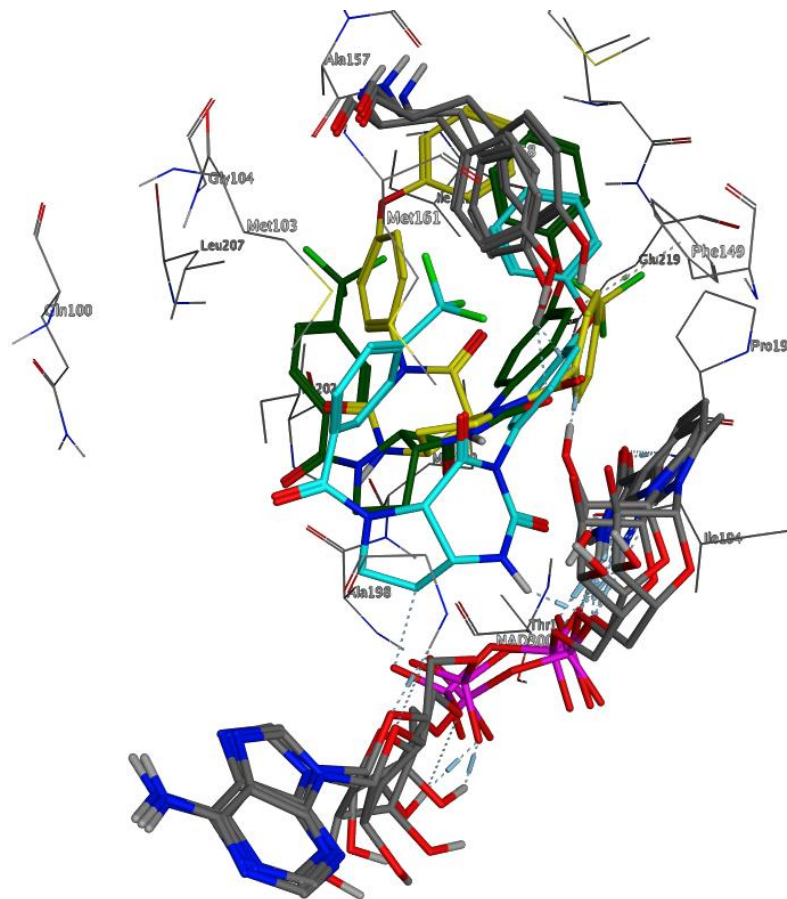
Obr. 43 2D interakční diagram sloučeniny 13 a struktury 4TZK.

Pro sloučeninu **13** byly hodnoty vazebné energie ve struktuře 1P44 - **10.99 kcal/mol** pro strukturu 2X23 - **12.02 kcal/mol** a pro strukturu 4TZK.- **11.84 kcal/mol**. Tyto hodnoty jsou ve všech strukturách velmi nízké.

2D diagramu struktury 1P44 odhaluje vodíkovou vazbu s Tyr158 a dále pak π -H interakci s Phe149. Ve struktuře 2X23 vidíme π - π interakci s molekulou NADH, která je popisována jako jedna z interakcí zodpovědných za účinek přímých inhibitorů InhA. Zároveň má sloučenina i vodíkovou vazbu s molekulou NADH. Dále pak vodíkovou

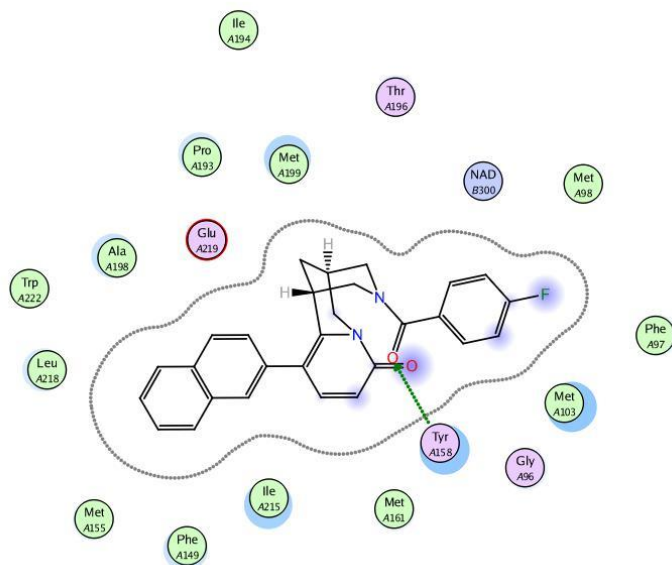
vazbu s Met98. V krystalografické struktuře 4TZK tvoří sloučenina vodíkovou vazbu s NADH.

Na 3D vizualizaci jsou nápadné interakce, které tvoří sloučenina **13s** molekulou NADH ve struktuře 2X23(tyrkysová).

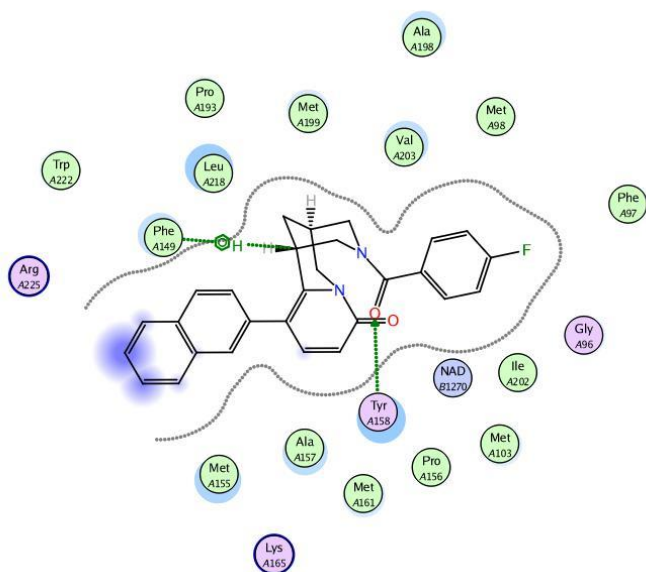


Obr. 44 3D vizualizace sloučeniny **13** zadockované v aktivním místě InhA

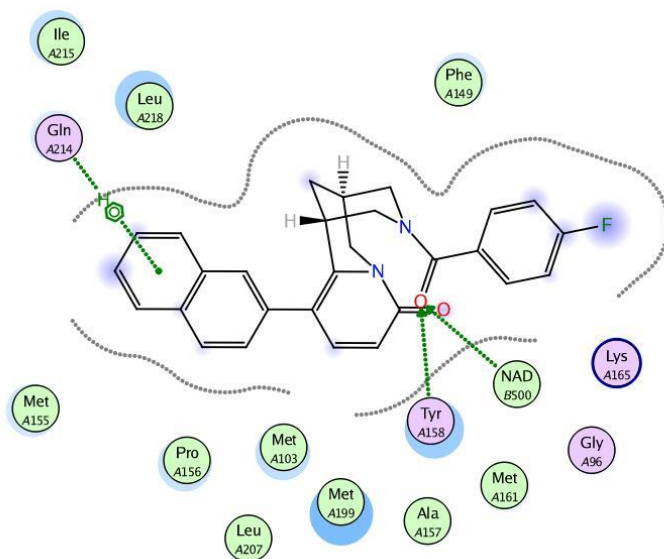
4.6. Sloučenina 15 Zinc05415069



Obr. 45 2D interakční diagram sloučeniny 15 a struktury 1P44



Obr. 46 2D interakční diagram sloučeniny 15 a struktury 2X23



Obr. 47 2D interakční diagram sloučeniny 15 a struktury 4TZK

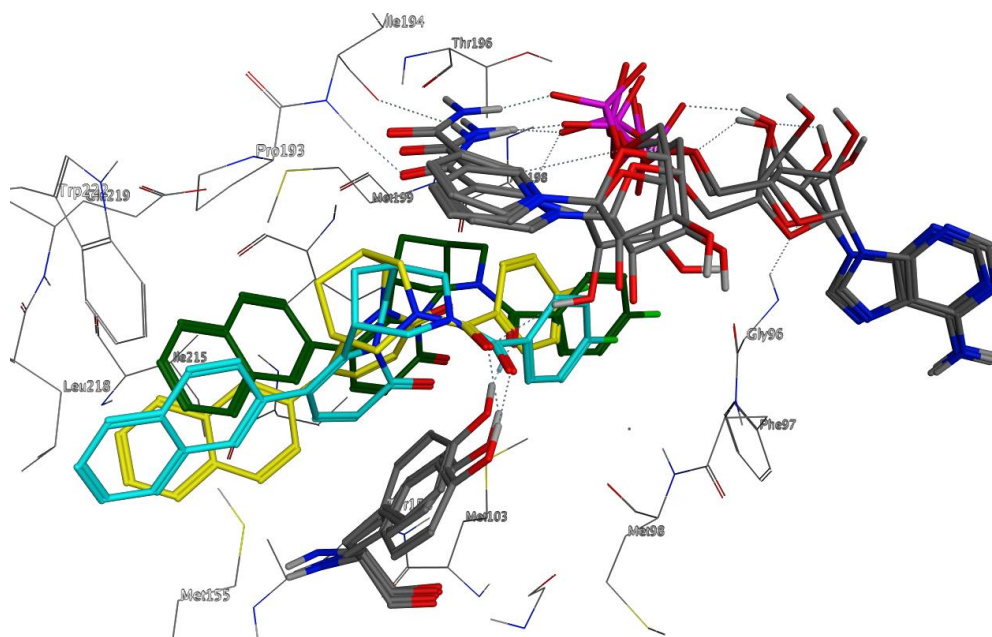
Pro sloučeninu **15** byly vypočítány hodnoty vazebné energie ve struktuře 1P44 - **10.99 kcal/mol**. 2X23 - **12.19 kcal/mol** a pro strukturu 4TZK to bylo - **11.96 kcal/mol**.

Tato sloučenina jako jediná ve všech 3 strukturách tvoří jednu z interakcí, která je popsána v kapitole **2.6**, jako důležitá pro mechanismus inhibice přímých inhibitorů. Přesněji se jedná o vodíkovou vazbu s Tyr158.

Vodíkovou vazbu s Tyr158 pozorujeme na všech 3 2D diagramech krystalografických struktur. 2D diagram struktury 2X23 pak dále naznačuje π -H interakci s Phe149. Ve struktuře 4TZK vytváří sloučenina kromě π -H interakce s Gln214 i vodíkovou vazbu mezi oxo skupinou sloučeniny a molekulou NADH. Tato vazba byla pozorována v krystalografických strukturách enzymu InhA s jeho přirozeným substrátem [15].

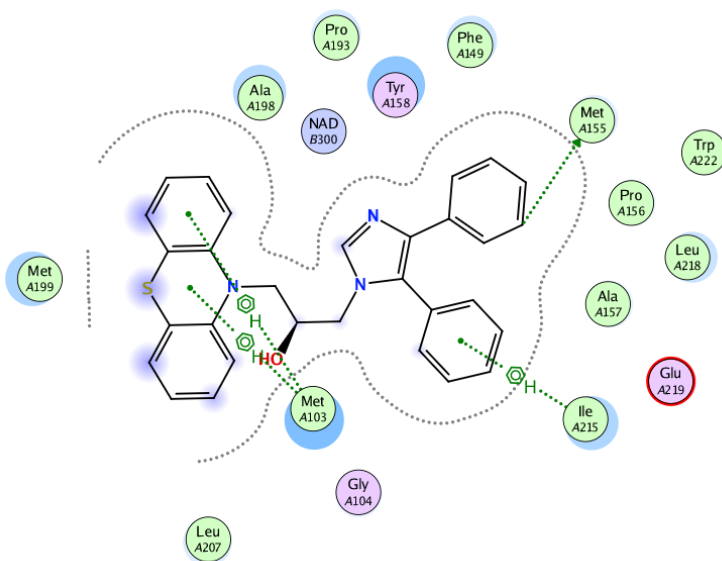
3D diagram pak odhaluje, že i pózy, do kterých se sloučenina dockuje, vykazují jistou míru překryvu.

Hodnoty této sloučeniny při pH 7 jsou: $\log P = \mathbf{4.91}$, molekulová hmotnost = **438.502(g/mol)**, počet donorů **0**, počet akceptorů **4**. Z těchto hodnot vyplývá, že sloučenina neporušuje ani jednu z podmínek Lipinského pravidel 5. Dá se tedy předpokládat její dobrý průchod biologickými membránami, který je podmínkou dobré biologické dostupnosti.

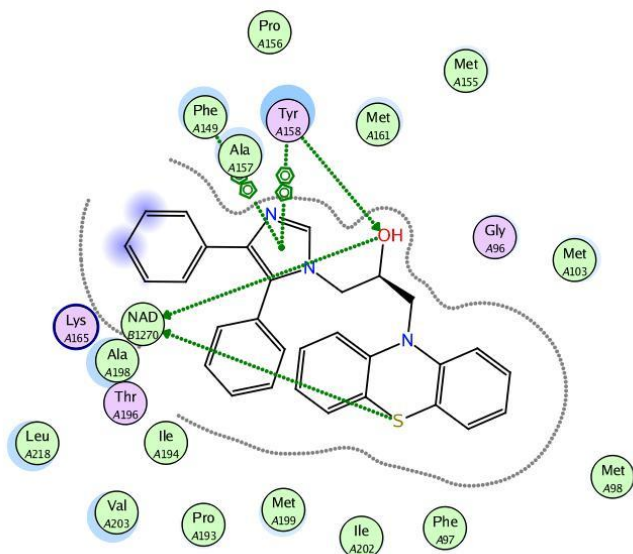


Obr. 48 3D vizualizace sloučeniny 15 zadockované v aktivním místě InhA

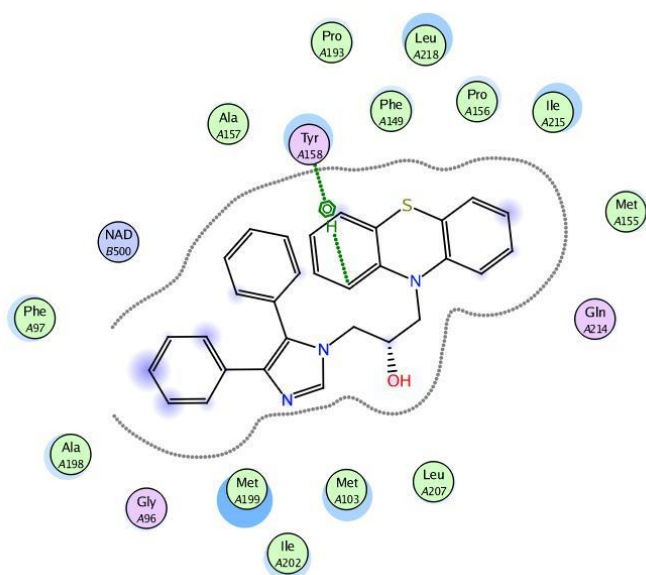
4.7. Sloučenina 17 Zinc08643197



Obr. 49 2D interakční diagram sloučeniny 17 a struktury 1P44



Obr. 50 2D interakční diagram sloučeniny 17 a struktury 2X23

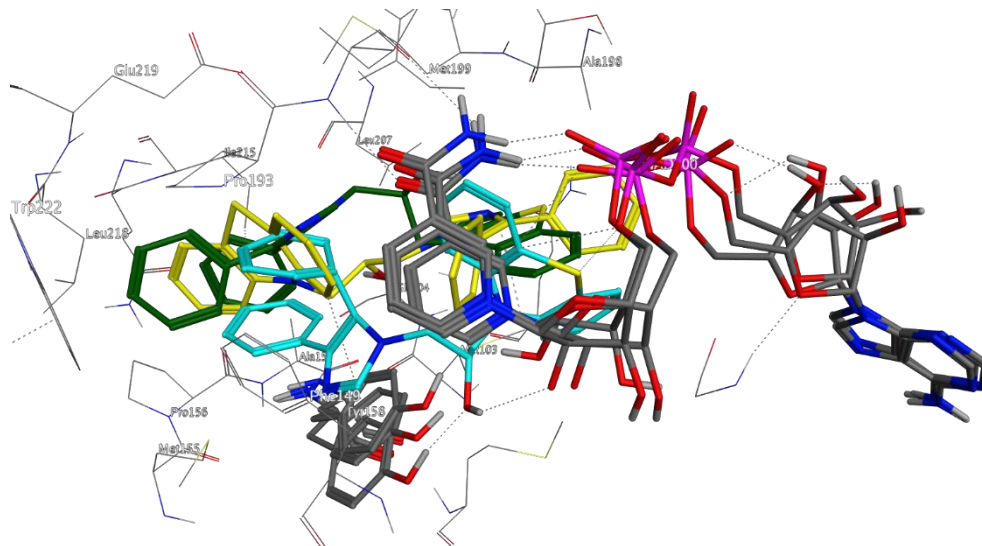


Obr. 51 2D interakční diagram sloučeniny 17 a struktury 4TZK

Sloučenina **17** se od ostatních vybraných sloučenin liší svojí chemickou strukturou, jak je patrné z 2D diagramů. Hlavní odlišností je přítomnost fenothiazinového kruhu, který jak ukazují 2D diagramy, hraje významnou roli při interakci sloučeniny a aktivního místa InhA.

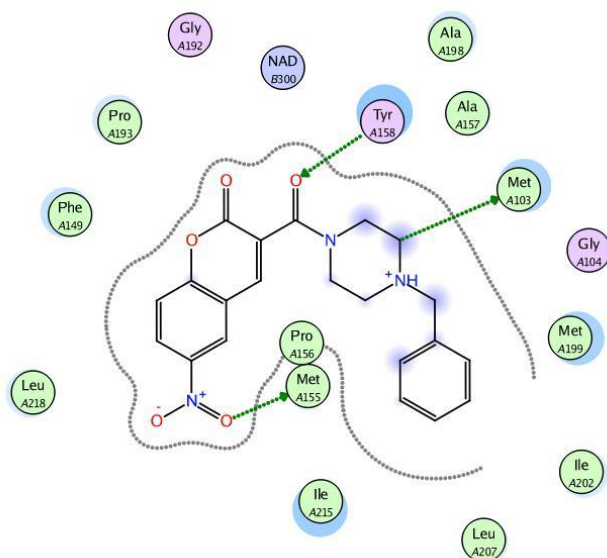
Struktura 1P44 při standartním nastavení vazebné energie nenaznačovala žádné interakce. Po úpravě vazebné energie se na 2D diagramu znázornily dvě π -H interakce s Met103 a fenothiazinovým kruhem, jedna π -H interakce s Ile215 a vodíková vazba s Met155. Fenothiazinový skelet je také místem interakce ve struktuře 2X23. Zde vzniká

vodíková vazba mezi atomem síry a molekulou NADH. Dále zde nalezneme další vodíkovou vazbu s molekulou NADH. Zároveň v této struktuře nalezneme i vodíkovou vazbu s Tyr158, který má ještě π - π interakci se sloučeninou. Poslední viditelná interakce je π - π interakce s Phe149. Ve struktuře 4TZK vidíme π -H interakci s molekulou Tyr158.

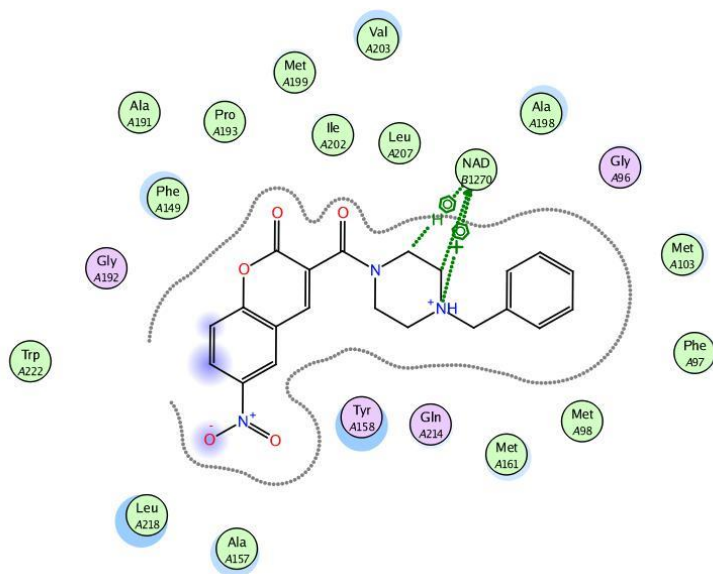


Obr. 52 3D vizualizace sloučeniny 17 zadockované v aktivním místě InhA

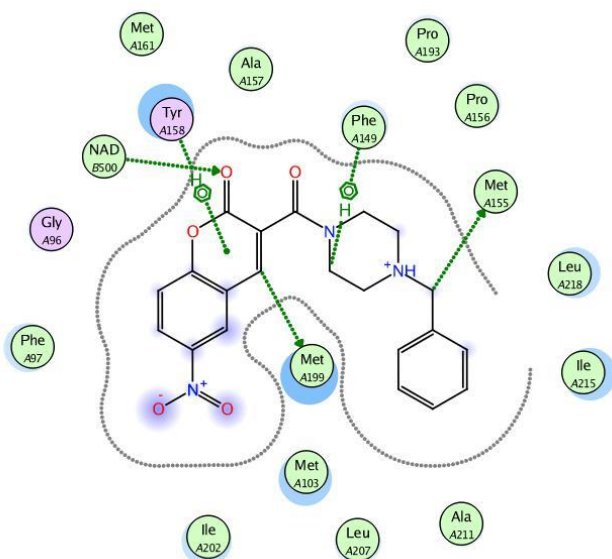
4.8. Sloučenina 18 Zinc19372079



Obr. 53 2D interakční diagram sloučeniny 18 a struktury 1P44



Obr. 54 2D interakční diagram sloučeniny 18 a struktury 2X23

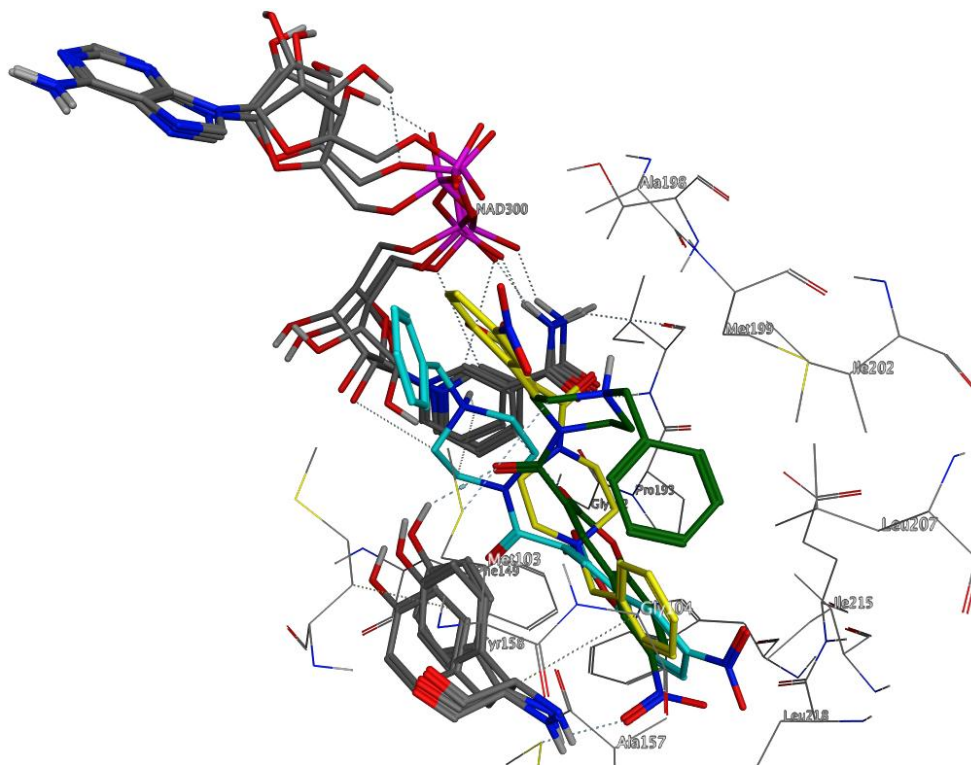


Obr. 55 2D interakční diagram sloučeniny 18 a struktury 4TZK

Hodnoty vazebné energie pro sloučeninu **18** byly **- 10.63 kcal/mol** pro 1P44, **- 9.52 kcal/mol** v 2X23 a **- 11.08 kcal/mol** pro strukturu 4TZK. Zvláště ve struktuře 2X23 se tedy, ve srovnání s ostatními sloučeninami, jedná o spíše nepříznivou hodnotu.

Na 2D diagramu 1P44 můžeme vidět vodíkovou vazbu s Tyr158 a další vodíkové vazby s Met155 a Met103. Struktura 2X23 ukazuje celkem 3 interakce mezi sloučeninou a molekulou NADH jedná se o vodíkovou vazbu, π -H interakci a π -kationt interakci. Ve struktuře 4TZK nalezneme vodíkovou vazbu s Met155, Met199 a s molekulou NADH, dále π -H interakce s Tyr158 a Phe149.

Z 3D vizualizace jsou patrné interakce s molekulou NADH ve struktuře 2X23. Můžeme si všimnout, že tyto interakce jsou výhradně na piperazinový kruh sloučeniny 18.



Obr. 56 3D vizualizace sloučeniny 18 zadockované v aktivním místě InhA.

5. Závěr

Z celkového počtu 30 793 sloučenin, které se nacházely v databázi sloučenin ZND se podařilo za pomoci metod virtuálního screeningu vyselektovat 22 sloučenin. Z těchto 22 sloučenin bylo vybráno 8 sloučenin, které ve většině případů vykazovaly potřebné interakce nebo dosahovaly nízkých hodnot vazebné energie. Z uvedených výsledků je patrné, že molekuly popsané v diskusi mají potenciál inhibovat InhA, i když ne vždy je možné pozorovat interakce typické pro popsané dosud popsané inhibitory. Velká flexibilita kavity aktivního místa a příklad mechanismu inhibice methylthiazolů však ukazují, že tyto interakce nejsou podmínkou účinku. Předkládané výsledky mohou v budoucnu napomoci hledání nových potenciálních antituberkulotik.

Dalšího z cílů práce, kterým bylo vyhledání optimálního nastavení parametrů programu pro docking MOE, bylo dosaženo.

Seznam použitých zkratek

ACP	Acyl carrier protein
AMK	Aminokyselina
EthA	Flavin dependentní monooxydáza aktivující ethionamid
FabA	Enoyl-ACP reduktáza bakterií
FabH	β -ketoacylACP syntáza
FAS I	Fatty acid synthase I
FAS II	Fatty acid synthase II
IC ₅₀	Poloviční inhibiční koncentrace
InhA	Enoyl-ACP reduktáza MTB
KasA	β -ketoacyl-ACP syntáza
KasB	β -ketoacyl-ACP syntáza
KatG	Mykobakteriální kataláza peroxidáza aktivující izoniazid
MabA	3-ketoacyl-ACP reduktáza
MBT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MK	Mykolové kyseliny
MOE	Molecular Operating Environment
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationship
TBC	Tuberkulóza
VS	Virtuální screening
WHO	World Health Organization
ZND	Zink Natural Derivates

Seznam obrázků a tabulek

OBR. 1 STAVBA BUNĚČNÉ STĚNY MBT	6
OBR. 2 FAS II DRÁHA SYNTÉZY; FABH: B-KETOACYLACP SYNTÁZA; MABA: 3-KETOACYL-ACP REDUKTÁZA; INHA: ENOYL-ACP-REDUKTÁZA A KASA, KASB: B-KETOACYL-ACP SYNTÁZA	8
OBR. 3 HOMOTETRAMER INHA 2X23	9
OBR. 4 VAZEBNÉ MÍSTO PRO SUBSTRÁT S JEHO REZIDUI [15; UPRAVENO]	9
OBR. 5 JEDNA ZE ČTYŘ PODJEDNOTEK INHA.	10
OBR. 6 REDUKCE DVOJNÉ VAZBY POMOCÍ INHA	10
OBR. 7 RIFAMPICIN	13
OBR. 8 ISONIAZID	13
OBR. 9 PYRAZINAMID	14
OBR. 10 ETAMBUTOL	14
OBR. 11 STREPTOMYCIN	15
OBR. 12 OBRÁZKY A) A C) NAZNAČUJÍ KLASICKÉ „IN“ POSTAVENÍ TYR158. OBRÁZKY B) A D) PAK POSTAVENÍ „OUT“ V PŘÍTOMNOSTI METHYL-THIAZOLŮ. [22]	17
OBR. 13 CHEMICKÁ STRUKTURA TRIKLOSANU	17
OBR. 14 OBECNÝ VZOREC DIFENYL ETHERU	18
OBR. 15 CHEMICKÁ STRUKTURA INDOL-5-AMIDU OZNAČENÉHO JAKO GENZ 10850	19
OBR. 16 OBECNÝ VZOREC PYRROLIDIN KARBOXAMIDŮ	19
OBR. 17 OBECNÝ VZOREC ARYLAMIDŮ	20
OBR. 18 HLAVNÍ STRUKTURA METHYL-THIAZOLŮ	20
OBR. 19 ISONIAZID	21
OBR. 20 ETHIONAMID	21
OBR. 21 BAREVNĚ ODLIŠENÉ KRYSTALOGRAFICKÉ STRUKTURY INHA S ROZDÍLNÝM VAZEBNÝM MÍSTEM PRO SUBSTRÁT (HORNÍ ČÁST)	25
OBR. 22 MOLEKULA GENZ 10850 A JEJÍ REDOCKOVANÁ PÓZA (ZELENĚ) VE STRUKTUŘE 1P44.	27
OBR. 23 MOLEKULA OZNAČENÁ PT70 A JEJÍ REDOCKOVANÁ PÓZA (ZELENĚ) VE STRUKTUŘE 2X23	28
OBR. 24 STRUKTURA INHIBITORU A JEJÍ REDOCKOVANÁ PÓZA (ZELENĚ) VE STRUKTUŘE 4TZK	28
OBR. 25 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 4 A STRUKTURY 1P44	36
OBR. 26 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 4 A STRUKTURY 2X23	37
OBR. 27 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 4 A STRUKTURY 4TZK	37
OBR. 28 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 4 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	38
OBR. 29 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 9 A STRUKTURY 1P44	39
OBR. 30 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 9 A STRUKTURY 2X23	39
OBR. 31 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 9 A STRUKTURY 4TZK	40

OBR. 32 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 9 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA _	41
OBR. 33 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 10 A STRUKTURY 1P44 _____	41
OBR. 34 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 10 A STRUKTURY 2X23 _____	42
OBR. 35 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 10 A STRUKTURY 4TZK _____	42
OBR. 36 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 10 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	43
OBR. 37 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 11 A STRUKTURY 1P44 _____	43
OBR. 38 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 11 A STRUKTURY 2X23 _____	44
OBR. 39 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 11 A STRUKTURY 4TZK _____	44
OBR. 40 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 11 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	45
OBR. 41 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 13 A STRUKTURY 1P44 _____	45
OBR. 42 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 13 A STRUKTURY 2X23 _____	46
OBR. 43 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 13 A STRUKTURY 4TZK. _____	46
OBR. 44 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 13 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	47
OBR. 45 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 15 A STRUKTURY 1P44 _____	48
OBR. 46 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 15 A STRUKTURY 2X23 _____	48
OBR. 47 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 15 A STRUKTURY 4TZK _____	49
OBR. 48 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 15 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	50
OBR. 49 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 17 A STRUKTURY 1P44 _____	50
OBR. 50 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 17 A STRUKTURY 2X23 _____	51
OBR. 51 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 17 A STRUKTURY 4TZK _____	51
OBR. 52 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 17 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA	52
OBR. 53 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 18 A STRUKTURY 1P44 _____	52
OBR. 54 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 18 A STRUKTURY 2X23 _____	53
OBR. 55 2D INTERAKČNÍ DIAGRAM SLOUČENINY 18 A STRUKTURY 4TZK _____	53
OBR. 56 3D VIZUALIZACE SLOUČENINY 18 ZADOCKOVANÉ V AKTIVNÍM MÍSTĚ INHA.	54

TABULKA 1 HODNOTY VAZEBNÝCH ENERGIÍ PRO NEJLÉPE OHODNOCENÉ PÓZY VE VŠECH 3 KRYSTALOGRAFICKÝCH STRUKTURÁCH. SLOUČENINY JSOU ŘAZENY, SESTUPNĚ PODLE SVÉHO ZINC ČÍSLA.....	32
TABULKA 2	35

Použitá literatura

- [1]. Tuberculosis (TB) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (accessed Aug 23, 2016).
- [2]. Potrepčiaková, S., Skříčková, J. Tuberkulóza. *Practicus*. **2008**, 7, 24-29.
- [3]. Daniel, T. The History Of Tuberculosis. *Respiratory Medicine* **2006**, 100, 1862-1870.
- [4]. Macela A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*; Grada: Praha, **2006**.
- [5]. Mycobacterium <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> (accessed Aug 23, 2016).
- [6]. Tu, H. Z., Chang, S. H. et al. Microscopic morphology in smears prepared from MGIT broth medium for rapid presumptive identification of Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium avium complex and Mycobacterium kansasii. *Association of Clinical Scientists* **2003**, 33:179-83.
- [7]. Homolka J.; Votava V. *Tuberkulóza*; Karolinum: Praha, **2012**.
- [8]. Votava, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*; Neptun: Brno, **2003**.
- [9]. Khandekar, S.; Gentry, D.; Van Aller, G.; Warren, P.; Xiang, H.; Silverman, C.; Doyle, M.; Chambers, P.; Konstantinidis, A.; Brandt, M. et al. Identification, Substrate Specificity, And Inhibition Of Thestreptococcus Pneumoniae -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (Fabh). *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 30024-30030.
- [10]. Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. Pathway To Synthesis And Processing Of Mycolic Acids In Mycobacterium Tuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews* **2005**, 18, 81-101.
- [11]. Brown, A.; Sridharan, S.; Kremer, L.; Lindenberg, S.; Dover, L.; Sacchettini, J.; Besra, G. Probing The Mechanism Of The Mycobacterium Tuberculosis -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III Mt fabh: FACTORS INFLUENCING CATALYSIS AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 32539-32547.
- [12]. Banerjee, A.; Sugantino, M.; Sacchettini, J.; Jacobs, W. The Maba Gene From The Inha Operon Of Mycobacterium Tuberculosis Encodes A 3 - Ketoacyl Reductase That Fails To Confer Isoniazid Resistance. *Microbiology* **1998**, 144, 2697-2704.
- [13]. Veyron-Churlet, R.; Guerrini, O.; Mourey, L.; Daffé, M.; Zerbib, D. Protein-Protein Interactions Within The Fatty Acid Synthase-II System Of Mycobacterium Tuberculosis Are Essential For Mycobacterial Viability. *Molecular Microbiology* **2004**, 54, 1161-1172.
- [14]. Škarydová, L., Wsól, V. Human microsomal reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily, *Drug Metabolism Reviews*, **2012** 44, 173-191.
- [15]. Rozwarski, D.; Vilcheze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. Crystal Structure Of The Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-ACP Reductase, Inha, In Complex With

- NAD⁺ And A C16 Fatty Acyl Substrate. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 15582-15589.
- [16]. Parikh, S.; Moynihan, D.; Xiao, G.; Tonge, P. Roles Of Tyrosine 158 And Lysine 165 In The Catalytic Mechanism Of Inha, The Enoyl-ACP Reductase From Mycobacterium Tuberculosis. *Biochemistry* **1999**, 38, 13623-13634.
- [17]. Pokorný, A.; Salajka, F.; Merta, Z. *Tuberkulóza*; Masarykova univerzita, Lékařská fakulta: Brno, **1998**.
- [18]. St. Georgiev, V. Treatment And Developmental Therapeutics Of Mycobacterium Tuberculosis Infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **1994**, 4, 157-173.
- [19]. Holas, O.; Ondrejcek, P.; Dolezal, M. Mycobacterium Tuberculosis Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors As Potential Antituberculotics: Development In The Past Decade. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2014**, 30, 629-648.
- [20]. FN Motol. Ústav lékařské mikrobiologie. *Virostatika a antituberkulotika*.
- [21]. Lu, X.; Huang, K.; You, Q. Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors: A Patent Review (2006 – 2010). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2011**, 21, 1007-1022.
- [22]. Shirude, P.; Madhavapeddi, P.; Naik, M.; Murugan, K.; Shinde, V.; Nandishaiah, R.; Bhat, J.; Kumar, A.; Hameed, S.; Holdgate, G. et al. Methyl-Thiazoles: A Novel Mode Of Inhibition With The Potential To Develop Novel Inhibitors Targeting Inha In Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 8533-8542.
- [23]. Parikh, S., Xiao, G. and Tonge, P. 'Inhibition of InhA, the enoyl reductase from Mycobacterium tuberculosis, by triclosan and isoniazid'. *Biochemistry*, **2000** 39, 7645–50.
- [24]. Luckner, S.; Liu, N.; am Ende, C.; Tonge, P.; Kisker, C. A Slow, Tight Binding Inhibitor Of Inha, The Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase From Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 14330-14337.
- [25]. Betts, J.; McLaren, A.; Lennon, M.; Kelly, F.; Lukey, P.; Blakemore, S.; Duncan, K. Signature Gene Expression Profiles Discriminate Between Isoniazid-, Thiolaactomycin-, And Triclosan-Treated Mycobacterium Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, 47, 2903-2913.
- [26]. Kuo, M.; Morbidoni, H.; Alland, D.; Sneddon, S.; Gourlie, B.; Staveski, M.; Leonard, M.; Gregory, J.; Janjigian, A.; Yee, C. et al. Targeting Tuberculosis And Malaria Through Inhibition Of Enoyl Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 20851-20859.
- [27]. He, X.; Alian, A.; Stroud, R.; Ortiz de Montellano, P. Pyrrolidine Carboxamides As A Novel Class Of Inhibitors Of Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase From Mycobacterium Tuberculosis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 6308-6323.
- [28]. He, X.; Alian, A.; Ortiz de Montellano, P. Inhibition Of The Mycobacterium Tuberculosis Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase Inha By Arylamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 6649-6658.

- [29]. Historie počítačové chemie <http://www.fi.muni.cz/ust/jkucera/pv109/2002/xvarekov.htm> (accessed Aug 23, 2016).
- [30]. Remko, M. *Molekulové Modelovanie*; Slovak Academic Press: Bratislava, **2000**.
- [31]. Spiwok, V. Králová, B. Virtuální Screening Léčiv. *Chemické listy*. **2009**, *103*, 52-55.
- [32]. M. Boisclair, D. Egan, K. Huberman, R. Infantino, High-Throughput Screening in Industry. *Anticancer Drug Development Guide*; Teicher, B. Andrews, P. Humana Press: Totowa, New Jersey., **2004**; 23-39
- [33]. Kubinyi, H. Opinion: Drug Research: Myths, Hype And Reality. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 665-668.
- [34]. Berka, K. Drug-Design - Racionální Návrh Léčiv KFC/DD, 04 – Strategie Hledání Léčiv, **2012**.
- [35]. Kuchař, M. *Výzkum A Vývoj Léčiv*; Vydavatelství VŠCHT: Praha, **2008**.
- [36]. Leach, A. *Molecular Modelling*; Prentice Hall: Harlow, England, **2001**.
- [37]. ZINC subset Znd <http://zinc.docking.org/subsets/znd> (accessed Aug 23, 2016).