

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyzikální chemie



**Molekulární dokování vybraných  
steroidních receptorů**

**Bakalářská práce**

Karolína Plánková  
Ing. Mgr. Václav Bazgier, PhD.

2023 Univerzita Palackého v Olomouci



### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Molekulární dokování vybraných steroidních receptorů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborných článků a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu použitých zdrojů. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva.

V Olomouci dne 3.5.2023

Karolína Plánková

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Mgr. Václavu Bazgierovi, PhD. za cenné rady, trpělivost a čas během vedení a vypracování mé bakalářské práce. Velký dík patří také mým rodičům a kamarádům, kteří mě ve studiu podporovali a věřili ve mně.

**Jméno a příjmení autora :** Karolína Plánková

**Studijní program:** Aplikovaná chemie

**Název práce :** Molekulární dokování vybraných steroidních receptorů

**Typ práce:** Bakalářská

**Pracoviště:** Katedra fyzikální chemie

**Vedoucí práce:** Mgr. Ing. Václav Bazgier, PhD.

**Rok obhajoby práce:** 2023

**Jazyk:** Český

**Klíčová slova:** Molekulární dokování, steroidy, receptor, ligand, hormony, aktivní místo, vazebné energie, vazebná afinita

**Počet stran:** 61

### **Abstrakt**

Cílem práce bylo pomocí metody molekulárního dokování, což je in silico metoda často využívaná pro objasnění biochemických procesů a nástroj pro vývoj racionálních léčiv, zjistit, jakým způsobem a s jakou vazebnou energií se do steroidních receptorů váží vybrané ligandy podobné látkám přirozeně se vázajících v těchto receptorech. Jako receptory byly vybrány mineralokortikoidní, glukokortikoidní, androgenní, progesteronový a čtyři varianty estrogenových receptorů z důvodu jejich velké rozlišnosti. Celkem došlo k dokování balíčku 162 ligandů strukturně podobným původním molekulám s rozlišnými funkčními skupinami.

Výsledkem práce je soubor přibližně patnácti ligandů u jednotlivých receptorů poskytujících nejvýhodnější vazebné energie z celkového počtu vybraných látek. Následně po porovnání vazebných afinit souboru patnácti ligandů mezi jednotlivými receptory bylo zjištěno, že určité molekuly poskytují výhodné vazebné energie u většiny, nebo nadpoloviční většiny receptorů. Jako nejlépe se vázající ligand můžeme označit 1-androstenedione, který figuroval u všech zmíněných steroidních receptorů kromě glukokortikoidního. Dále zde figurovaly také 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN, 5-androstenedione a boldenone. Obecně lze říci, že až na výjimky byly látky, které se čteně opakovaly anabolické steroidy.

**Autor's name and surname :** Karolína Plánková

**Studied programme:** Applied chemistry

**Title :** Molecular docking of selected steroid receptors

**Type of thesis:** Bachelor

**Department:** Department of physical chemistry

**Supervisor:** Mgr. Ing. Václav Bazgier, PhD.

**Year of presentation:** 2023

**Language:** Czech

**Keywords:** Molecular docking, steroids, receptor, ligand, hormones, active site, binding energies, binding affinity

**Number of pages:** 61

### **Abstract**

Purpose of this work was molecular docking of small steroid substances into steroid receptors and finding out how those molecules bind into active site of the receptors and what binding affinity they provide. Molecular docking is in silico method often used for explanation of biochemical functions and rational drug design. Mineralocorticoid receptor, glucocorticoid receptor, androgen receptor, progesterone receptor and four types of estrogen receptors (for its big varieties) were chosen for this experiment. Overall 162 ligands structurally similar to steroid hormones, which bind naturally to those receptors, were docked.

The outcome of this work is complex of approximately fifteen ligands for each steroid receptor providing the best binding affinities. After comparing those binding affinities of each receptor between each other was found out that some molecules show convenient binding energies in more than one receptor. It can be said that the best binding ligand for most of the receptors is 1-androstenedione, which showed up in every receptor except glucocorticoid one. Then there are ligands that had good binding energy in majority of the receptors - 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN, 5-androstenedione and boldenone. It can be generally said that most of the best binding ligands were anabolic steroids.

# Obsah

Úvod .....	8
<b>1. Teoretická část.....</b>	<b>9</b>
1.1 Molekulární dokování .....	9
1.1.1 Algoritmy pro vyhledávání pózy .....	10
1.1.2 Skórovací funkce molekulového dokování.....	11
1.1.3 Postup molekulového dokování.....	14
1.1.4 Programy používané pro molekulární dokování.....	15
1.2 Steroidy a steroidní receptory .....	16
1.2.1 Steroidní receptory .....	16
1.2.2 Steroidy a steroidní struktury.....	18
1.2.3 Steroidní hormony .....	20
<b>2. Praktická část .....</b>	<b>23</b>
2.1 Metodika .....	23
2.1.1 Podmínky dokování .....	23
2.1.2 Výběr steroidních receptorů.....	24
2.1.3 Zpětné dokování .....	24
2.1.4 Vyhledávání ligandů a databáze .....	24
2.1.5 Dokování.....	24
2.1.6 Aktivní místo .....	25
2.2 Postup práce .....	26
<b>3. Výsledky a diskuze .....</b>	<b>29</b>
3.1 Progesteronový receptor.....	29
3.2 Androgenní receptor.....	32
3.3 Glukokortikoidní receptor.....	35
3.4 Mineralokortikoidní receptor .....	38
3.5 Estrogenový receptor .....	41
3.5.1 Estrogenový receptor alfa vázající estradiol.....	41
3.5.2 Estrogenový receptor alfa vázající genistein .....	44
3.5.3 Estrogenový receptor beta vázající genistein.....	47
3.5.4 Estrogenový receptor alfa vázající 4-hydroxytamoxifen.....	50
3.6 Celkové výsledky .....	53
<b>4. Závěr .....</b>	<b>55</b>
<b>5. Summary.....</b>	<b>56</b>
<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>57</b>

## Úvod

Molekulární dokování je in silico metoda založená na generování množství póz ligandu za pomoci algoritmů v aktivním místě receptoru a dále jejich ohodnocení pomocí skórovacích funkcí. Tato metoda se hojně využívá v lékařském průmyslu pro návrh léčiv a objasňování biologických funkcí. Výhodou je zejména časová nenáročnost v porovnání s experimentem a díky tomu lze vyzkoušet vazbu velkého množství malých látek.

Existuje celá řada algoritmů pro vyhledávání vazebných póz ligandů, kterých vygenerují obrovské množství. Tyto algoritmy jsou založeny na nacházení globálního nebo lokálního minima volné vazebné energie. Zařadit můžeme například metodu Monte Carlo, která hledá globální minimum, metodu sdružených gradientů, nebo také genetické algoritmy fungující na principu „genetických procesů“.

Po vygenerování póz algoritmy přicházejí na řadu skórovací funkce, které v zásadě udávají přesnost a spolehlivost dokování a jejich úkolem je ohodnocení jednotlivých vygenerovaných póz. Lze je rozdělit do čtyř základních kategorií - skórovací funkce vycházející ze silových polí, empirické, znalostní a kvantově mechanické. Jelikož skórovací funkce hrají v molekulárním dokování zásadní roli, je také důležité vybrat vhodně zvolený program pro požadovaný výzkum.

Při samotném experimentu je podstatné zvážit několik parametrů – vhodný ligand – jeho tautomery, konformaci a flexibilitu a vhodný receptor – identifikovat aktivní místo a zvážit konformace a rotamery jeho aminokyselin. Jako každou metodu, tak i dokování provází řada problémů, zejména s prostorovým upořádáním receptoru i ligandu, proto musí být pečlivě zvoleny.

Tato práce se zabývá molekulárním dokováním steroidních struktur podobných původně navázaným steroidním hormonům do jejich steroidních receptorů. Steroidní receptory jsou z funkčního hlediska transkripční faktory hormonů, které se po jejich navázání do aktivního místa aktivují a regulují jejich genovou expresi. Pro každou skupinu hormonů existuje jejich receptor – pro estrogeny estrogenový, pro androgeny androgenní atp. Vyskytují se ve formě jaderné a mimojaderné nacházejících se v cytoplazmatické membráně nebo buněčných zásobách. Steroidy vstoupí do buňky, kde se nachází daný receptor a naváží se do jeho aktivního místa. Receptory následně v jádře interagují s DNA interagujícími prvky, dochází ke změně exprese mRNA a ty mění expresi proteinů.

Do těchto receptorů dochází k dokování steroidních struktur. Steroidy jsou organické molekuly, které obsahují čtyři cyklické kruhy a jejich základní kostru tvoří steran. Steroidy plní mnoho funkcí jako například regulační nebo endokrinní. Tyto látky lze dále dělit do několika skupin – na anabolické steroidy – látky podobné testosteronu plnící anabolické funkce, spojit si je lze se zneužíváním ve sportu – steroly – nacházející se v membráně endoplazmatického retikula, zaujímající důležitou funkci pro správné fungování membrán – kortikosteroidy – uvolňované kůrou nadledvin plnící protizánětlivé funkce a jsou imunními modulátory a steroidní hormony – lipofilní deriváty cholesterolu, nacházející se zejména v endokrinních orgánech jako vaječníky, varlata nebo kůra nadledvin, rozdělit je lze na estrogeny, progesterony, androgeny, mineralokortikoidy a glukokortikoidy.

Dokování proběhlo do aktivních míst steroidních receptorů – estrogenních, progesteronového, androgenního, mineralokortikoidního a glukokortikoidního. Jako ligandy byly vybrány struktury podobné jejich původně vázaných molekul – tedy steroidních hormonů s různými funkčními skupinami a následně byla zkoumána jejich vazebná afinita v jednotlivých steroidních receptorech.



# 1. Teoretická část

## 1.1 Molekulární dokování

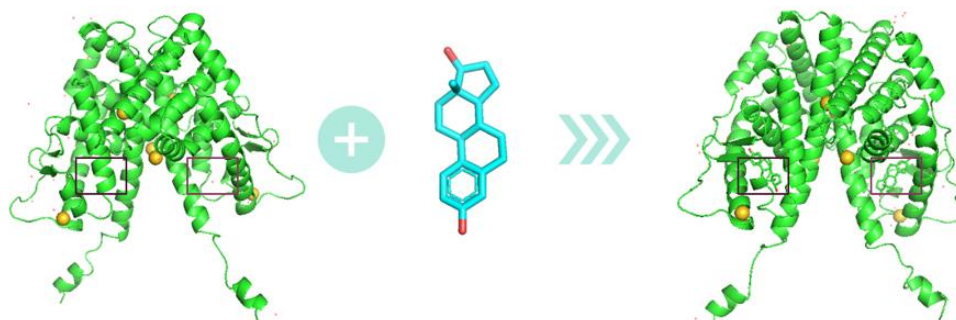
Vzhledem k tomu, že farmaceutický a biologický průmysl je stále náročnější na objem dat, který ke svému výzkumu potřebují nebo vyprodukují, vyžadují tyto odvětví nástroje informatiky. Molekulární dokování je in silico metoda založená na nalezení co nejlepší pózy a vazebné energie mezi ligandem a komplexem. V posledních letech je tato metoda široce používána pro návrh léčiv v oblasti výzkumu. V této oblasti se používá zejména k předpovědi vazebné orientace malých molekul k jejich biomolekulárnímu cíli, což je nejčastěji protein nebo sacharid. Tímto způsobem získáme hrubá data pro racionální návrh léčiv s lepší účinností a větší specifitou. V tomto odvětví je molekulové dokování velmi výhodný způsob, jak zvýšit účinnost a snížit náklady na výzkum [1,3,4].

První dokovací programy navazovaly na vývoj programů molekulární grafiky, které sloužily k nacházení různých konfigurací, které se zdály komplementární jak geometricky, tak chemicky. Programy molekulového dokování umožnily automatizaci a zjednodušení těchto metod. Jakým způsobem mohou dvě molekuly interagovat je obrovský a proto je tato metoda zjednodušením těchto interakcí. První protein-protein dokování využívalo pouze rigidní tělo aproximace, atomy byly zastoupeny jen explicitně a k vyhodnocení docházelo za použití funkcí potenciální energie. Při pozdějším vývoji se pokoušelo reprodukovat známou krystalovou strukturu komplexu BTI-trypsin protein – protein komplex. Funkce k vyhodnocení se skládala z nevazebného členu a členu povrchu plochy. Dále byly nejlepší skórovací modely upřesněny pomocí funkce potenciální energie skládajícího se z nevázaného členu a solventu [5].

Od této doby bylo vyvinuto mnoho algoritmů, které zkoumají flexibilitu ligandu a omezenost flexibility receptoru. Tato schopnost reprodukovat známe struktury komplexů protein-ligand umožnila obrovský posun v oblasti structure-based drug designu. Sloučeniny, které mají z obrovského množství screeningových databází nejlepší skóre jsou dále syntetizovány a testovány, což markantně sníží časovou i finanční náročnost [5].

Díky algoritmům dochází k vyhodnocení nejlepšího „fitu“ mezi malou nekomplexní molekulou (v některých případech také proteinem) a větší komplexní molekulou, jako je například protein nebo receptor. Molekulové dokování je drug design metoda založená na simulaci vazby mezi těmito dvěma molekulami a předpovídá způsob vazby a vazebnou afinitu. V molekulovém dokování dochází k predikaci optimální konformace, tedy vzájemné

geometrie komplexu, podle komplementarity, která by mohla předpovědět vazebnou afinitu, neboli sílu vazby mezi ligandem a receptorem [1,2,3,4].



Obrázek 1. Grafické znázornění molekulového dokování

Molekulové dokování, jako zřejmě každou metodu, provází řada problémů. Největším úskalím je zejména prostorová orientace ligandu, zvláště jeho translace a rotace, musí být správně prostorově vyhraněny, aby pokryly plochu aktivního místa, dále také jeho konformace a flexibilita. Způsob zahrnutí flexibility proteinu, nebo role solventu mohou hrát při této metodě také významnou roli [1].

Každý dokovací program zahrnuje dva klíčové kroky. Prvním z nich je vyhledání vazebné pózy, neboli konformačních a konfiguračních stupňů. Jedná se o vygenerování masy póz v aktivním, neboli vazebném místě. Druhým krokem je ohodnocení těchto póz pomocí skórovacích nebo vyhodnocovacích funkcí. Tento proces zahrnuje výpočet skóre a prozkoumání energetických hladin pomocí algoritmů k nalezení optimálního energetického minima. Tento algoritmus ohodnocuje různé polohy ligandu v aktivním místě komplexu pomocí translačních a rotačních stupňů volnosti, dále také pomocí torzních úhlů. Tento druhý krok dokáže vyhodnotit energeticky nejvýhodnější a nejpravděpodobnější pozici a vazbu mezi receptorem a ligandem [1,3].

### 1.1.1 Algoritmy pro vyhledávání pózy

Vyhledávací algoritmy se v molekulovém dokování používají pro vyhledávání množství vazebných póz. Fungují na principu vyhledávání oblastí volné minimální energie, neboli nejlépe se vážící komplex. Jsou-li entropie a entalpie soustavy správně modelovány funkcí energie, bude tato oblast minimální energie odpovídat experimentální konformaci a vazbě mezi receptorem a ligandem, neboli přirozený vazebný mód a lokální minima budou odpovídat tomu alternativnímu. Tyto algoritmy mohou být rozděleny dle hledání globálního nebo lokálního minima [1,6].

Metoda nejrychlejšího sestupu je typ algoritmu, kde podle spočítaného gradientu zjistíme, jakým směrem energie klesá nejvíce, ve směru tohoto gradientu se atomy přesunou

o stanovenou délku a opět dojde k přepočítání gradientu. Minimalizace této energie najde nejbližší minimum počáteční energie, jedná se tedy o metodu hledající lokální minimum [1,7].

Metoda sdružených gradientů je metoda hledající lokální minimum, kdy dojde ke spočítání gradientů potenciální funkce pro jednotlivé atomy a dojde k posunu v ortogonálním směru [1].

Metoda Monte Carlo je metoda vyhledávající globální minimum. Toto označení je velmi obecné a v podstatě označuje jakoukoliv metodu, kde se vyskytují stochastické procesy a následné náhodné vzorkování. Pomocí principu Metropolisovy metody se generují náhodné pohyby v systému, které tento systém buď přijme, nebo odmítne na základě Boltzmanovy pravděpodobnosti. Funguje na principu umístění náhodného bodu do boxu se známými rozměry, který obsahuje celou molekulu a je určeno, zda je tento bod umístěn v solventu, nebo v molekule. Body umístěné v molekule a celkový počet bodů se dají do poměru a z nich se vypočítá celkový objem molekuly. Tuto metodu využívají programy jako AutoDock, ProDock, nebo IMC [8,9].

Genetické algoritmy, jak už napovídá název, fungují na principech genetiky. Dochází ke generování „populace“ možných řešení pomocí genetických funkcí jako jsou například mutace nebo crossovery, stejně jako v biologických genetických procesech. Genetické algoritmy fungují pomocí vytváření „fingerprintů“ ze vzájemných vzdáleností. Tyto proměnné lze považovat za geny stejně jako při pohlavním rozmnožování, kdy se následně vytvářejí nové generace pólů. Stejně jako u všech algoritmů jsou tyto pózy následně ohodnoceny pomocí skórovacích funkcí. Programy využívající genetická algoritmy jsou například GOLD, AutoDock nebo DARWIN [1,9].

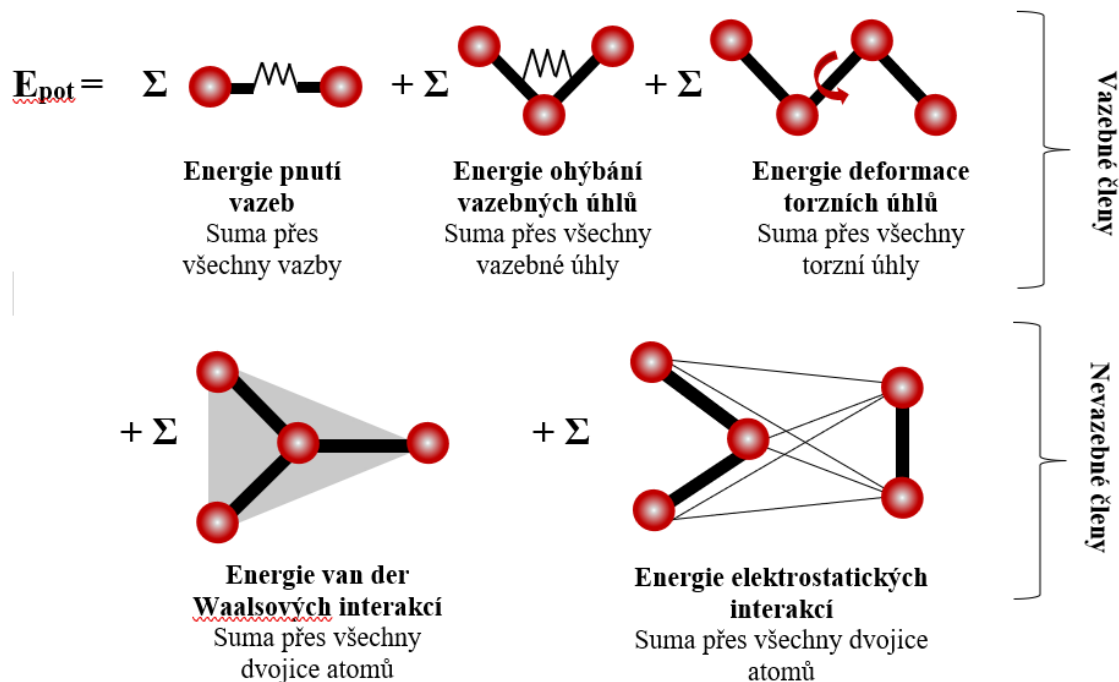
Při metodě simulovaného žíhání přidáváme molekule kinetickou energii „žíháním“, aby došlo k překonání bariér na povrchu molekuly, ta se dále chladí a tím dochází k uchycení v jednotlivých lokálních minimech [1].

### 1.1.2 Skórovací funkce molekulového dokování

Molekulové dokování, jeho přesnost a spolehlivost, je závislé na výběru skórovací funkce. Tato skórovací funkce je funkce, která slouží k výpočtu vazebného skóre nebo energie mezi vybraným ligandem a komplexem v jeho aktivním místě. Navzdory rozsáhlému výzkumu je přesnost a rychlost protein-ligandových interakcí stále problematická. Existují čtyři základní typy skórovacích funkcí – skórovací funkce vycházející ze silových polí, empirické, znalostní a kvantově mechanické. Dle nového výzkumu se toto rozdělení mírně liší – rozeznáváme fyzikálně založené skórovací funkce (physics-based), empirické, znalostní a metoda „strojového učení“ (machine learning-based). Fyzikálně založené metody dále dělíme na metody vycházející ze silových polí, solventové metody a kvantově mechanické metody [5,10].

### 1.1.2.1 Skórovací funkce vycházející ze silových polí

Tato skórovací funkce vychází z atomových interakcí a ze sčítání Van der Waalsových, elektrostatických interakcí mezi atomy ligandu a proteinu a dále také zohledňuje rozpínání vazby, její ohyb a torzi [1,11].



Obrázek 2: Schéma rovnice pro potenciální energii skórovací funkce ze silových polí, převzato a upraveno z [1]

Tato skórovací funkce je sice přesně fyzikálně vymezená a jednoduchá, jejím problémem je však otázka zahrnutí solventu, dále také musíme znát všechny vazebné a nevazebné parametry [1,11].

Díky tomu, že chceme, aby byly tyto skórovací funkce co nejjednodušší a nejrychlejší, přicházejí v potaz mnohá zjednodušení. Disociace vazeb velmi často neuvažujeme, délku vazeb a vazebné úhly můžeme brát jako konstantu a hodnota diherálních úhlů bývá brána jako libovolná. Výsledek toho zjednodušení je rovnice, ve které vystupuje pouze nekovalentní interakce protein-ligand. Skórovací funkce typu silových polí jsou také často používány v molekulové dynamice. Jedna z nejpoužívanějších funkcí založena na silových polích je funkce AMBER [1,11,12,13,14].

### 1.1.2.2 Empirické skórovací funkce

Dalším druhem skórovacích funkcí jsou funkce empirické. Ty fungují na principu odhadu vazebné energie komplexu na základě souboru vážených energetických podmínek. Výhodou empirických skórovacích funkcí je její rychlost výpočtu skóre díky její jednoduchosti rovnice energie a dále také schopnost rozpoznat např. vodíkové vazby a nebo patrové interakce mezi aromatickými kruhy. Díky použití různých energetických rovnic

a termínů jsou empirické funkce používány v mnoha známých protein-ligand dokovacích programech [11].

Empirické skórovací funkce spojují prvky jak skórovacích funkcích založených na silových polích, tak znalostních skórovacích funkcích. Obsahují také některé podobné termíny, jako skórovací funkce ze silových polí, ale dále navíc obsahují složitější členy, jako je hydrofobní a desolvatační interakce, které skórovacími funkcemi vycházejících ze silových polí nelze snadno vyřešit [13].

Tato skórovací funkce je také méně náchylná k „overfittingu“ a může nám také poskytnout vzhled do jednotlivých molekulárních interakcí vazebné afinity [10].

Empirická skórovací funkce počítá vhodnost vazby mezi proteinem a ligandem pomocí sumarizace jednotlivých příspěvků a termínů, kde každý z nich představuje důležitý příspěvek k celkové rovnici [12].

Nejvíce používanou empirickou skórovací funkcí je funkce ChemScore, která je dána následující rovnicí, kde

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_0 + \Delta G_{hbond} S_{hbond} + \Delta G_{metal} S_{metal} + \Delta G_{lipo} S_{lipo} + \Delta G_{rot} H_{rot} \quad (1)$$

$S_{hbond}$  je trend pro popis vodíkových vazeb,  $S_{lipo}$  trend pro popis lipofilních interakcí,  $S_{metal}$  trend pro popis interakcí s kovy a  $H_{rot}$  je trend pro popis ztráty konformační entropie při vazbě substrátu. Dále parametry  $\Delta G_x$  jsou jednotlivé regresní koeficienty přisuzované váze jednotlivých interakcí [1].

### 1.1.2.3 Znalostní skórovací funkce

Znalostní skórovací funkce fungují na principu odvození zjednodušených potenciálů přímo z databází strukturních dat. Hlavním rozdílem mezi empirickými a znalostními skórovacími funkcemi je, že ke znalostním funkcím nepotřebujeme znát žádná vazebná data. K popisu této skórovací funkce můžeme použít Boltzmannovu konstantu [5,1],

$$A_{i,j}(r) = -kT \ln \frac{g_{i,j}(r)}{g(r)} \quad (2)$$

kde  $A(i,j)$  je potenciální energie mezi atomy „i“ a „j“,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $g_{i,j}(r)$  znázorňuje pravděpodobnost atomového páru „i“ a „j“ být v kontaktu na vzdálenost „r“ a dále  $g(r)$  je normalizovaná referenční pravděpodobnost [5].

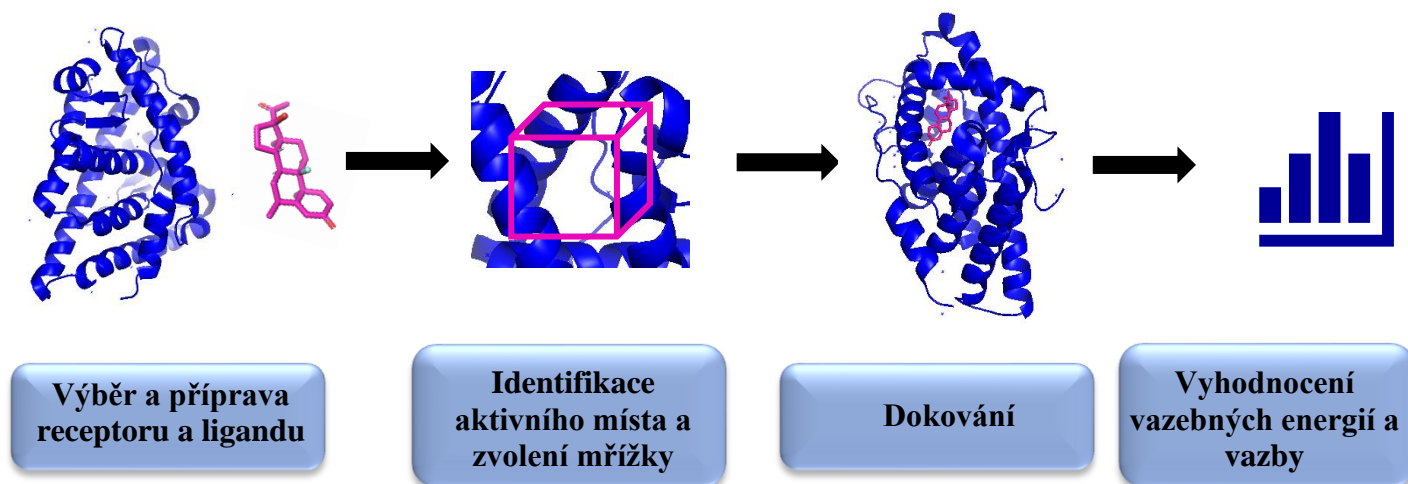
### 1.1.2.4 Kvantově mechanické skórovací funkce

Kvantově mechanické skórovací funkce, ačkoliv molekulovým interakcím nejsou nijak neznámé, byly doposud používány pouze pro menší systémy kvůli finanční náročnosti na počítačové vybavení. Avšak tato metoda je v současné době na rozmachu. Tyto skórovací funkce jsou založeny na výpočtech kvantové mechaniky mezi interakcí protein-ligand. Kvantově mechanické výpočty jsou teoreticky velmi přesné, jelikož v zásadě počítají se

všemi příspěvky energie – jako například přenos náboje, elektronová polarizace nebo halogenovou vazbu – což například ve skórovacích funkcích vycházejících ze silových polí chybí [1,15,16].

### 1.1.3 Postup molekulového dokování

Obecný postup molekulového dokování spočívá v první řadě z přípravy a výběru vhodného receptoru a ligandu. Receptory a ligandy je možné stáhnout z databází, nebo vytvořit vlastním modelováním. Tyto struktury jsou následně převedeny do formátu vhodného pro dokování a následně je v receptoru identifikováno aktivní místo a velikost mřížky pro dokování. V dalším kroku už pokračuje samotné dokování, ke kterému dochází pomocí algoritmů a skórovacích póz. Po ukončení dokování dojde k vyhodnocení výsledků, zejména vazebné afinity a samotné pozici ligandu



Obrázek 3: Schéma postupu molekulárního dokování

#### 1.1.3.1 Příprava ligandu

Příprava ligandu se skládá z řešení dvou otázek – otázka náboje a tautomerizace a dále konformace a flexibility. V otázce náboje a tautomerizace je nutné zvážit přesun náboje uvnitř molekuly. Vhodné je se poradit s experty v oblasti organické chemie nebo danou problematiku nastudovat v odborné literatuře. V otázce konformace a flexibility řešíme zejména rotaci kolem torzních úhlů rotovatelných molekul. V případě aromatických kruhů je nutnost určit typ konformace [1].

#### 1.1.3.2 Příprava receptoru

Nejdůležitějším krokem v přípravě receptoru je identifikace jeho aktivního místa. Tento krok je možný provést dle místa vazby původního ligandu, nebo najít potřebné informace ve vhodných publikacích. Jelikož v některých případech se aktivní místo receptoru přizpůsobuje ligandu a dokování je velmi citlivé na konformaci receptoru, je

vhodné vybrat takový receptor, aby ligand, který budeme dokovat, částečně strukturně odpovídal ligandu původnímu [1].

Dalším faktorem, který je nutno brát v potaz jsou aminokyseliny. Ty se mohou vyskytovat v mnoha různých tautomerech, rotamerech a protonacích [1].

#### 1.1.4 Programy používané pro molekulární dokování

Molekulární dokování není pouze samotné vázání ligandu a komplexu v jeho aktivním místě, ale také ho doprovází spousta doprovodných a přípravných kroků. Na samém počátku přichází otázka výběru vhodného ligandu a komplexu. Tyto molekuly je možné získat jako .pdb soubory z různých databází – například RCSB PDB, Zinc, DrugBank a další, nebo se nabízí možnost ligandy nakreslit v programech pro to uzpůsobených (např. MarvinSketch) [51,52].

Dále je nutnost obě molekuly pro dokování upravit a následně je převést do vhodného formátu pro dokování. Tyto kroky je možné provést například v Pymolu a následně AutoDock Tools. Posledním krokem je již samotné dokování pomocí výpočetních programů. Programů používaných pro molekulární dokování je ale velké množství. Fungují na různých druzích algoritmů a skórovacích funkcí – například DOCK, AUTODOCK, FlexX, GOLD nebo Glide.

V dalších kapitolách se zaměřím na programy, které byly použity v bakalářské práci, jak pro samotné dokování, tak pro přípravné kroky.

##### 1.1.4.1 Marvin Sketch, PyMOL a AutoDock



Marvin Sketch je program primárně sloužící k tvorbě molekul a jejich kreslení ve 3D formátu. Při molekulárním dokování se používá zejména při prvním kroku dokování.

Obrázek 4: Logo MarvinSketch



PyMol je vizualizační program především pro úpravu a práci se strukturami molekul. V případě dokování se používá zejména pro zobrazení grafických výsledků, dále pro zobrazení vazeb mezi nadokovaným ligandem a proteinem v jeho aktivním místě.

Obrázek 5: Logo PyMOLu, převzato z : <https://lammpstube.com/wp-content/uploads/2019/12/autodock-software.jpg>



AutoDock je balíček obsahující dva programy – mezi sebou kompatibilní AutoDock Tools a AutoDock Vina. První ze zmíněných programů slouží pro přípravu molekul. Jeho důležitou funkcí je také možnost nastavení gridu, neboli boxu. AutoDock Vina je již samotný výpočetní dokovací program uplatňující empirické skórovací funkce. Jeho prostředí je ve formě příkazového řádku.

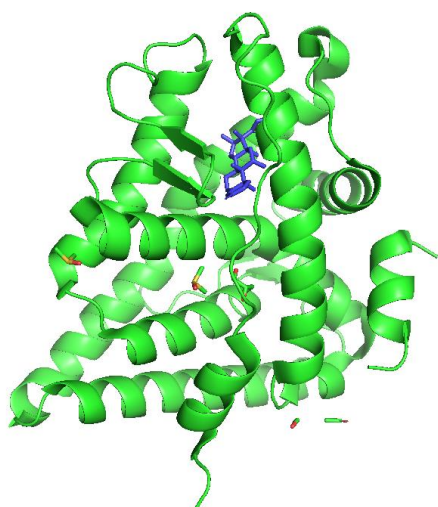
Obrázek 6: Logo AutoDocku, převzato z : <https://seeklogo.com/images/P/pymol-logo-D17FF8A6DB-seeklogo.com.png>

## 1.2 Steroidy a steroidní receptory

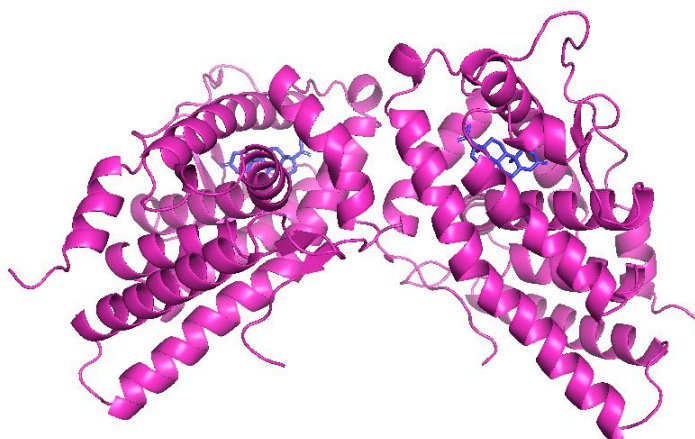
### 1.2.1 Steroidní receptory

Receptory steroidních hormonů (obrázky 7-10) jsou transkripční faktory, které regulují expresi cílových genů. Tyto receptory existují ve formě jaderné a mimojaderné vyskytující se v buněčných zásobách nebo plazmatické membráně. Tyto receptory obsahují čtyři domény – regulační doménu amino konce, DNA vázající doménu, ligand vázající doménu a oblast pantu. Jakmile se steroidní hormon naváže na ligand vázající doménu receptoru, dojde ke konformačním změnám receptoru a následném oddělení chaperonu (jako je například heat-shock protein 90). Dále také dochází k odhalení jaderné lokalizační sekvence. Tento proces umožňuje jadernou translokaci a dimeraci receptoru s navázaným steroidním hormonem a jeho navázání na cílové buňky v jejich promotorových oblastech a tím reguluje genovou expresi [17,18,19].

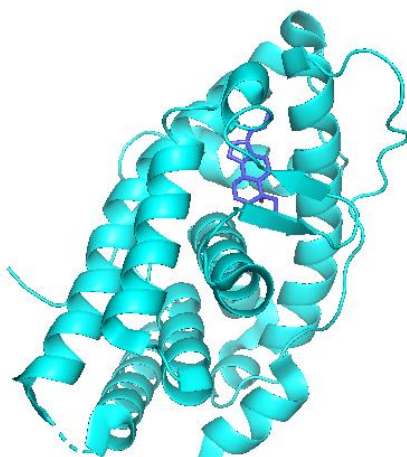
Steroidy vstupují do buněk přes plazmatickou membránu a váží se na jejich receptor lokalizovaný v cytoplazmě nebo jádře buňky. Receptory se poté přesunou do jádra a zapojí se do interakce se specifickými DNA interagujícími prvky pro regulaci transkripce cílových genů. Tyto interakce vedou ke změně v expresi mRNA, které obvykle mění expresi proteinů a buněčnou biologii [19].



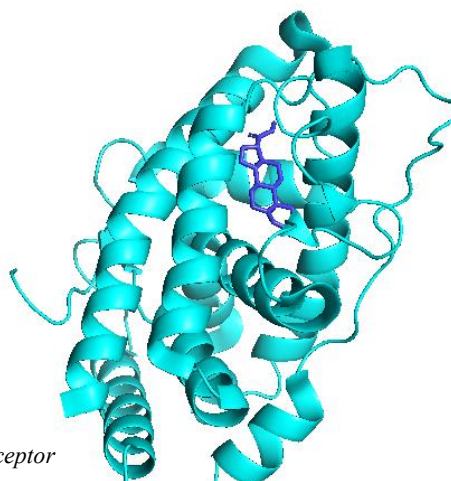
Obrázek 8: Glukokortikoidní receptor



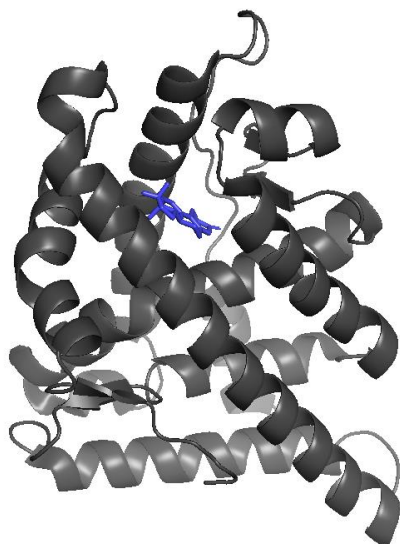
Obrázek 7: Progesteronový receptor



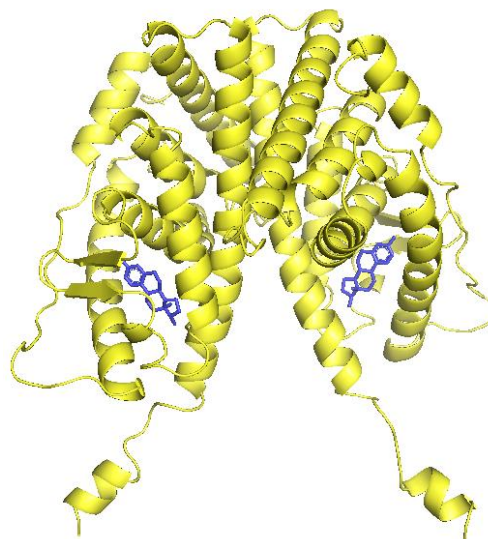
Obrázek 10: Mineralokortikoidní receptor







Obrázek 10: Androgenní receptor



Obrázek 11: Estrogenový receptor

### 1.2.1.1 Mineralokortikoidní a glukokortikoidní receptor

Glukokortikoidní a mineralokortikoidní receptory jsou lokalizovány v limbických neuronech, neokortexu a mozku. Mineralokortikoidní receptor má vysokou afinitu ke kortikosteronu a je satureován nízkými bazálními hladinami hormonu, naopak glukokortikoidní receptor má nízkou afinitu k tomuto hormonu a je aktivován vysokou hladinou hormonu. Glukokortikoidní receptor je zároveň přítomen ve většině tělních buněk, jelikož glukokortikoidy se podílejí na mnoha fyziologických funkcích esenciálních pro život. Mineralokortikoidní receptor hraje významnou roli v řízení transportu sodíku a draslíku v epitelárních buňkách, zejména v ledvinách a tlustém střevě. Důležitou funkci má také v neepitelárních tkáních jako jsou srdeční myocyty a krevní cévy [20,21,22,23].

### 1.2.1.2 Androgenní receptor

Androgenní receptory jsou ligandem aktivované jaderné transkripční faktory androgenů. Jsou lokalizovány na chromozomech X a skládají se z 8 exonů. V nedávných studiích byly také popsány a identifikovány účinky androgenního receptoru nezávislého na ligandu. Jeho exprese je rozšířená v mnoha tkáních a buňkách. Tento receptor má rozlišnou škálu biologických funkcí – hraje roli při vývoji zejména mužských reprodukčních orgánů, kosterního a svalového systému, imunitního a nervového systému. Dále je androgenní receptor například hlavním iniciátorem a růstovým faktorem rakoviny prostaty, ale také močového měchýře a plic [18,24].

### 1.2.1.3 Estrogenový receptor

Estrogenový receptor je receptor estrogenů, sloužící jim jako transkripční faktor, který po aktivaci vytváří přímou nukleární interakci. Tento receptor existuje ve dvou typech –  $\alpha$  a  $\beta$ . Pomocí těchto podtypů receptor vykonává expresi příslušných hormonů - estrogenů. Estrogenový receptor cílí na mnoho různých typů tkání a hladiny přítomnosti obou typů receptorů se velmi liší. Nachází se zejména v buňkách ženských

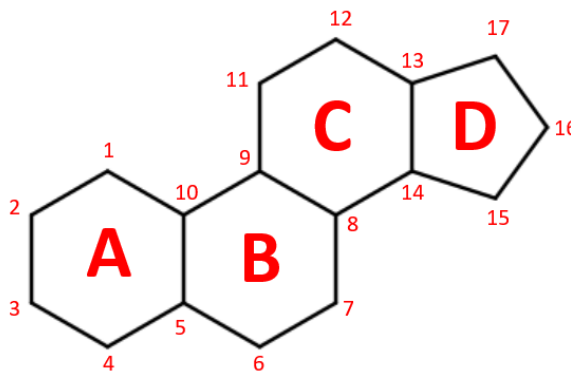
pohlavních orgánů, ale také například v některých typech nádorových buněk. Nejvýznamnější vliv má na vývoj ženských pohlavních orgánů, ukládání vody, ovlivňuje kostní sílu a také dokáže ovlivnit paměť [25,26].

#### 1.2.1.4 Progesteronový receptor

Progesteronový receptor je hlavním regulátorem v oblasti ženského reprodukčního systému. Je vylučován výhradně v ženských pohlavních orgánech a v centrálním nervovém systému. Řídí vývoj proliferační a diferenciací fáze reprodukčního cyklu a těhotenství. Dále hraje progesteronový receptor roli při patogenních procesech endokrinně-dependentní formy karcinomu prsu. Variabilita činností tohoto receptoru je poměrně široká. Záleží na mnoha faktorech, které jeho funkci ovlivňují. Mohou to být typ tkáně, typ buněk, ve kterých působí, dostupnost koregulačních proteinů a dalších. Existují dva progesteronové receptory A a B, které mají různý systém transkripční aktivace [27,28].

#### 1.2.2 Steroidy a steroidní struktury

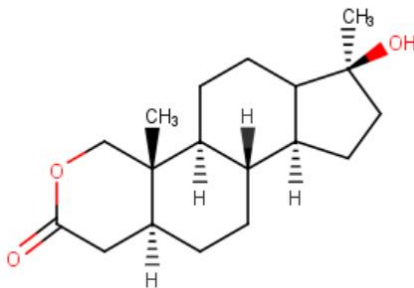
Steroidy jsou komplexní struktury organického původu obsahující čtyři kruhy. Základní stavební strukturou je steran, což je uhlovodík, který se skládá ze tří kruhů cyklohexanu a na nich navázaného kruhu cyklopentanu. Steroidní struktury mají mnoho účelů a rolí. Jsou to strukturální složky buněčných membrán, plní funkci regulační nebo endokrinní. Specificky upravené steroidy se ale mohou také vyskytovat v epidermis, játrech nebo mozku. Steroidy se z funkčního hlediska dělí na anabolické steroidy, steroly, kortikosteroidy a reprodukční steroidy [29].



Obrázek 11: Struktura steranu

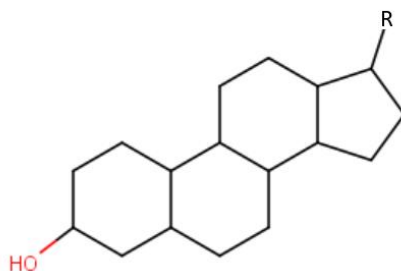
Anabolické steroidy jsou látky syntetické povahy odvozené od testosteronu. Tyto steroidy vykazují zvláště anabolické účinky hormonů, tzn. působí periferně, podporují stimulaci dusíku v těle a tvorbu proteinů ve svalích. Anabolické steroidy stimulují růst a funkci mužských pohlavních orgánů, spermatogenezi v Sertoliho buňkách a růstu sekundárních pohlavních mužských znaků. Pojem anabolický steroid si můžeme spojit se zneužíváním zejména v oblasti sportu na podporu růstu svalů a zvýšení síly. Zároveň bylo ale zjištěno, že napomáhají růstu kosterních svalů, používají se při léčbě opožděné puberty

a nemocí spojených s chřadnutím organismu jako je například HIV. Jako zástupce můžeme uvést například oxandrolon [30,31,32,33].



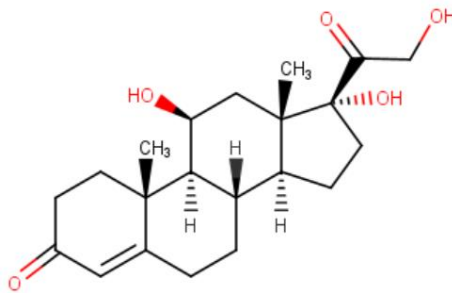
Obrázek 12: Struktura oxandrolonu

Steroly jsou amfipatické lipidy eukaryotických buněk a plní signální a strukturní funkce. Nacházejí se v membráně endoplazmatického retikula a významně přispívají k permeabilitě membrány (zabraňují příliš těsnému kontaktu mezi acylovými řetězci fosfolipidů), pomáhají udržovat membránový potenciál a jsou schopny tvořit dvojvrstvé struktury. Dále také napomáhají udržet mechanickou stabilitu membrán, díky zprostředkování interakce mezi steroidními jádry a acylovými řetězci mastných kyselin fosfolipidů. Steroly mají v poloze tři hydroxylovou skupinu a obsahují alifatický řetězec v poloze 17. Vyskytují se buď volně, nebo jako esterifikované molekuly – sterol estery. Mezi nejvýznamnější steroly patří ergosterol nebo lanesterol nacházející se v kvasinkách, v rostlinách sitosterol a stigmasterol [34,35].



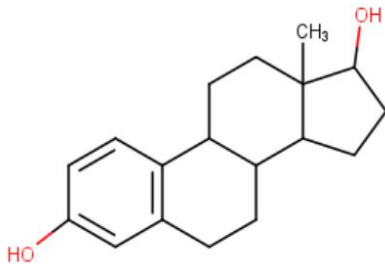
Obrázek 13: Struktura sterolu

Kortikosteroidy jsou steroidy uvolňované kůrou nadledvin a zahrnují mineralokortikoidy a glukokortikoidy. Glukokortikoidy jsou regulátory v oblasti metabolismu, homeostázy zánětů a jsou považovány za imunní modulátory. Kortikosteroidy jsou široce využívány v oblasti medicíny jako protizánětlivé léky. Nejvýznamnějším kortikosteroidem je kortizol [36].

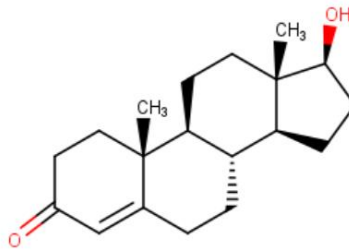


Obrázek 14: Struktura kortizolu

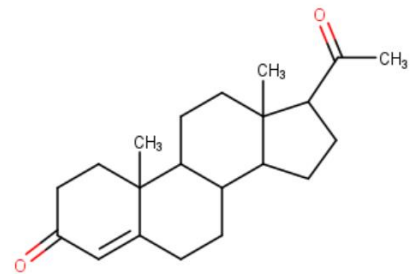
Reprodukční steroidy jsou hormony produkované endokrinními žlázami. Řídí sexuální chování, připravují organismus na reprodukci a regulují koncentraci iontů v tělních tekutinách. Dále jsou zodpovědné za sekundární pohlavní znaky, fyziologické pohlavní změny, ke kterým dochází během puberty a reprodukčních fází pohlavních žláz. Tyto steroidy jsou primárně syntetizovány v dospělých pohlavních žlázách. Jsou to estrogeny (např. estradiol), androgeny (např. testosteron) a progestageny (např. progesteron) [29,37].



Obrázek 16: Struktura estradiolu



Obrázek 17: Struktura testosteronu



Obrázek 15: Struktura progesteronu

### 1.2.3 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou lipofilní deriváty cholesterolu. V těle jsou všechny steroidy syntetizovány z cholesterolu přes úzce regulovanou biochemickou enzymatickou dráhu. Tato dráha funguje převážně v endokrinních orgánech, jako jsou kůra nadledvin (zde jsou syntetizovány glukokortikoidy, mineralokortikoidy a nadledvinové androgeny), vaječníky a placenta (syntéza estrogenů, progesteronů a progestinů) a varlata (syntéza testikulárních androgenů a estrogenů). Steroidní hormony jsou transportovány krví do jejich cílových buněk, kde jsou navázány na nosný protein a protože jsou to látky lipofilní povahy, projdou přes buněčnou membránu difuzí. Kromě toho, že se tyto hormony váží na jejich cílové buňky, váží se také na steroidní receptory, které jsou hlavní mediátory jejich reakcí. Steroidní receptory jsou dále napojeny na chaperony, neboli heat shock proteiny, které brání agregaci a napomáhají skládání proteinů. Glukokortikoidy a estrogeny jsou také známé svými účinky jako regulátory periferním imunitních odezev a také vykazují protizánětlivé vlastnosti v mozku [29,38,39].

### 1.2.3.1 Estrogeny

Estrogeny jsou hormony produkované vaječníky a placentou. Dále ale také může docházet k syntéze estrogenů z androgenů, nebo k tvorbě v adipózní tkáni. Fyziologické funkce estrogenů u žen zahrnují vývoj sekundárních pohlavních znaků, regulují sekreci gonadotropinů pro ovulaci, regulují syntézu lipoproteinů a regulují odezvu insulinu. U mužů hrají estrogeny roli při splynutí epifýz. Estrogeny podporují růst kostí do délky, uzavírání růstových zón a zrání kostí jak u mužů, tak u žen. Další výzkum také uvádí, že estrogeny mají pozitivní vliv na zánětlivá onemocnění, jelikož muži obecně trpí větším počtem zánětlivých onemocnění a dále větší mortalitou, než ženy [40,41,42].

### 1.2.3.2 Progesteron

Progesterony hrají významnou roli v oblasti ženské reprodukce a těhotenství. Umožňují přechod endometria z proliferálního do sekrečního stádia a usnadňuje unášení blastocyst a uvolnění zralých oocytů. Důležitou roli má také v ostatních tkáních spojených s reprodukčním systémem, jako je prsní žláza a její funkce spojené s kojením, v kardiovaskulárním systému, centrálním nervovém systému a kostech. V mozku zprostředkovává signály potřebné k sexuálně citlivému chování [43,44].

### 1.2.3.3 Androgeny

Hlavním úkolem androgenů je vývoj mužských pohlavních žláz a pohlavních znaků. Dále také mají vliv na vývoj a zrání prostaty a ovlivňují proliferaci a diferenciaci laminárního epitelu. Jsou důležité pro zahájení spermatogeneze a udržení jejího fungování. Androgeny mají velký vliv na růst kostí končetin. Přímo působí na chondrocyty v růstové ploténce, zvyšuje syntézu koagulačních faktorů a nepřímo zvyšují koncentraci hemoglobinu. Tyto hormony jsou aktivní v několika druzích kosterních buněk – v osteoblastech, osteoklastech a osteocytech. Androgeny také zvyšují retenci dusíku, tvorbu svalové hmoty a přispívají k udržení tělesné hmotnosti [40,45,46].

### 1.2.3.4 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou hormony produkované kůrou nadledvin a regulaci tvorby řídí přední lalok hypofýzy. Tato skupina hormonů působí na jako regulátor glykoregulace, glukózové tolerance a řídí velké množství metabolických dějů důležitých pro život. Hrají významnou roli pro udržení bazální homeostázy a homeostázy spojené se stresem, díky tomu bývají běžně používány jako biomarkery stresu. Jsou účastníky téměř každé buněčné, fyziologické a molekulární interakce organismu a hrají klíčovou roli v biologických procesech jako je rozmnožování, růst, imunitní a zánětlivé reakce a funkce kardiovaskulárního a centrálního nervového systému. Hlavním zástupcem této skupiny hormonů je kortizol a kortikosteron [40,47,22].

#### 1.2.3.5 **Mineralokortikoidy**

Jak již napovídá název mineralokortikoidů, slouží v těle v roli metabolismu minerálů, jako je sodík a draslík. Jsou produkovány kůrou nadledvin. Hlavním a nejdůležitějším mineralokortikoidem je aldosteron. Ten vykazuje účinky na transport elektrolytů přes epitelární buňky [48].

## 2. Praktická část

### 2.1 Metodika

Pro dokování bylo vybráno 5 steroidních receptorů – progesteronový receptor (1a28), estrogenové receptory (1a52, 1x7j, 1x7r, 3ert), androgenní (1e3g), mineralokortikoidní (1y9r) a glukokortikoidní receptor (6nwk). Do těchto receptorů byly nadokovány struktury, které jsou strukturně podobné ligandům, které receptory přirozeně váží – progesteron, estrogeny (estriol, estradiol, estron), cortisol, aldosteron a dexamethason. Bylo vybráno celkem asi 160 struktur, které odpovídají těmto původním ligandům a jsou steroidní povahy. Tyto ligandy dále obsahují různé postranní řetězce, nebo skupiny. Cílem práce bylo zjistit, zda se některý alternativní ligand váže do aktivního místa receptoru s lepší vazebnou energií, neboli má větší afinitu, než ligand původní. Dále bylo úkolem toto aktivní místo v okolí 5 Å popsat a zamyslet se nad otázkou, které funkční skupiny mohou tuto vazbu receptor-ligand pozitivně nebo negativně ovlivnit.

#### 2.1.1 Podmínky dokování

Jako aktivní místo receptoru 1y9r, receptoru 1a52 a receptoru 6nwk bylo vybráno společné místo o souřadnicích center\_x = 66.752, center\_y = 123.822, center\_z = 10.521. Společné souřadnice mohly být použity díky překrytí všech tří receptorů v aktivním místě. Pro aktivní místo receptoru 1a28 byly vybrány následující souřadnice : center\_x = 38.63, center\_y = 33.852, center\_z = 39.534. Pro receptor 1e3g byly použity souřadnice aktivního místa jako center\_x = 3.818, center\_y = 28.631, center\_z = 3.932. Pro estrogenové receptory 1x7j, 1x7r a 3ert bylo vybráno společné aktivní místo se souřadnicemi center\_x=108.4, center\_y=15.4, center\_z=95.9. Tyto hodnoty jsou zaneseny v tabulce 1.

Tabulka 1: Souřadnice aktivních míst jednotlivých receptorů

Aktivní místo			
receptor	souřadnice "x"	souřadnice "y"	souřadnice "z"
1y9r			
1a52	66,752	123,822	10,521
6nwk			
1a28	36,630	33,852	39,534
1e3g	3,818	28,631	3,932
1x7j			
1x7r	108,400	15,400	95,900
3ert			

Parametr dokování „exhaustivness“ byl použit 16. Exhaustivness je hodnota času, která je strávena nad hledáním pravděpodobnosti nalezení globálního minima skórovací funkce, dá se tedy říci, že se jedná o hodnotu úsilí, kterou dokovací program vynaloží na hledání tohoto minima.

Velikost gridu byla nastavena na 20Å ve všech třech rozměrech, jednalo se tedy o krychli.

### 2.1.2 Výběr steroidních receptorů

Steroidní receptory byly vybrány po konzultaci s vedoucím bakalářské práce. Byly vybrány následující – mineralokortikoidní, glukokortikoidní, progesteronový, čtyři estrogenové receptory a androgenní receptor. Tyto receptory byly následně staženy z RCSB PDB databáze, zobrazeny v PyMOLU a byl jim odebrán původní ligand.

### 2.1.3 Zpětné dokování

Pro začátek práce byla použita metoda zpětného dokování. Při této metodě je z receptoru s navázaným původním ligandem tento ligand vyjmut a následně pomocí dokování zpět navázán. Tato metoda slouží k ověření správnosti dokování a dále také k vyzkoušení samotné metody dokování. V případě této bakalářské práce byla tato metoda aplikována na steroidní receptory s původními ligandy zmíněnými výše.

V tomto kroku práce šlo především o načerpání zkušeností pro samotnou následující práci, zejména o nastudování a praktické vyzkoušení přípravy ligandu i receptoru, práci s programy – PyMOL, AutoDock Tools, AutoDock Vina a Marvin Sketch.

Po proběhlém dokování byla struktura zobrazena s původním receptorem v PyMOLU, porovnála se původní vazba a orientace ligandu v aktivním místě původního a znovu nadokovaného receptoru.

### 2.1.4 Vyhledávání ligandů a databáze

Dalším krokem bylo vyhledávání vhodných ligandů pomocí databází. Použity byly databáze RCSB PDB, Zinc a primárně Drugbank. Drugbank byla databáze, která byla použita nejvíce z důvodu velmi přehledného vyhledávání přímo samostatných ligandů. Dále také poskytovala funkce jako možnost zobrazení podobných struktur, nastavení rozpětí molekulové hmotnosti a také možnost nakreslení ligandu [49,50].

Cílené ligandy měly být strukturně podobné původním steroidním hormonům, jednalo se tedy o ligandy steroidního původu. Dalším kritériem byla také molekulová hmotnost a celková prostorová velikost ligandů – nesměly mít velkou hmotnost a velikost, aby se do aktivního místa vešly a úspěšně navázaly.

Ligandy bylo následně nutné stáhnout přímo z databází, nebo nakreslit v programu Marvin Sketch.

V začátku práce bylo vybráno celkem 22 struktur, které byly následně nadokovány do všech steroidních receptorů. Tento prvotní krok sloužil k vizualizaci vazeb a energií a následnému naplánování dalšího postupu práce.

Následně bylo vybráno asi 140 podobných struktur původním ligandů, které byly následně nadokovány do aktivních míst všech steroidních receptorů.

### 2.1.5 Dokování

Prvních 22 struktur bylo nadokováno pomocí AutoDock Vina verze 1.1.2 každý samostatně, pro osvojení metody dokování. Připravené .pdbqt soubory ligandu a receptoru byly nadokovány a následně byla jejich prostorová orientace v aktivním místě receptoru vyhodnocena v programu PyMOL, kde došlo k porovnání prostorové orientace s ligandem



původním. Následně se porovnávala vazebná energie – zda měl původní ligand větší, nebo lepší afinitu k receptoru (afinita původního ligandu byla získána zpětným dokováním) [50].

Dalších 140 ligandů již bylo nadokováno pomocí skriptu na univerzitním clusteru Melian a následně došlo k opětovnému dokování 22 ligandů pomocí skriptu. Další kroky byly poté shodné jako při dokování samostatněm.

#### 2.1.6 Aktivní místo

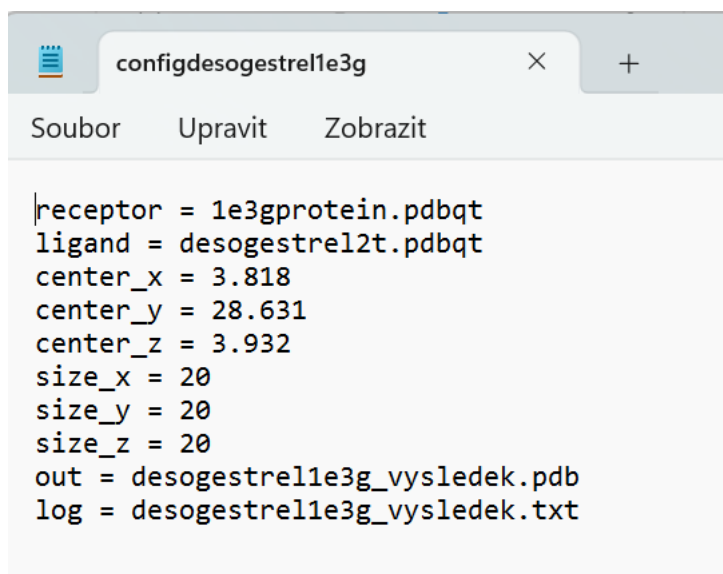
Aktivní místo bylo popsáno v okolí 5 Å pomocí aminokyselin. U každé aminokyseliny nacházející se v tomto prostoru byla určena její polarita. Dále probíhala úvaha nad možnostmi, jak polární aminokyseliny ovlivňují vazbu ligandů do aktivního místa.

## 2.2 Postup práce

Samotný experiment se skládal z několika fází. Prvním krokem bylo stáhnutí receptorů z PDB RSCB databáze – jednalo se o progesteronový receptor (PDB ID 1a28), estrogenové receptory (PDB ID 1a52, PDB ID 1x7j, PDB ID 1x7r, PDB ID 3ert), androgenní (PDB ID 1e3g), mineralokortikoidní (PDB ID 1y9r) a glukokortikoidní receptor (PDB ID 6nwk).

Tyto receptory byly zobrazeny v PyMOLu a byly jim odebrány původní ligandy. Následně byly pomocí funkce `A>remove waters` odejmuly vody a pomocí `A>hydrogens>add` přidány vodíky jak na receptor, tak na ligand. Receptor byl následně zobrazen v programu AutoDock Tools verze 1.5.7. V tomto programu byl ligand i receptor převeden do požadovaného .pdbqt formátu.

Dále přišla na řadu potřeba připravit konfigurační soubor pro dokování, kde byly nastaveny požadované parametry dokování. Tento dokument obsahoval název receptoru a ligandu, který byl dokován s příponou .pdbqt. Následovalo nastavení velikosti gridu ve třech rozměrech x, y a z. V neposlední řadě došlo k výběru souřadnic středu aktivního místa, také ve třech rozměrech – x, y a z. Souřadnice aktivního místa se vybírají pomocí původního ligandu zobrazením jeho dat v textovém souboru – vybrány byly souřadnice „středu“ molekuly. Následně byl nastaven název výstupních souborů jako textový soubor .txt pro výsledné energie a .pdb soubor.



```
receptor = 1e3gprotein.pdbqt
ligand = desogestrel2t.pdbqt
center_x = 3.818
center_y = 28.631
center_z = 3.932
size_x = 20
size_y = 20
size_z = 20
out = desogestrel1e3g_vysledek.pdb
log = desogestrel1e3g_vysledek.txt
```

Obrázek 18: konfigurační soubor s nastavenými parametry

Následovalo již samotné dokování v programu AutoDock Vina verze 1.1.2. Pomocí příkazového řádku `cmd` byla spuštěna Vina. Zde se pomocí příkazu `vina.exe --config názevkonfiguračního souboru.txt` spustilo samotné dokování. Po několika sekundách již Vina dokončila dokování a vygenerovala výsledek, který je zobrazen na obrázku 19 [50].

```

#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite: #
# #
# O. Trott, A. J. Olson, #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####
Detected 8 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1094972264
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.

mode | affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |    -2.9   |    0.000   |    0.000
  2   |    -0.7   |    1.287   |    4.197
  3   |    -0.6   |    2.835   |    6.952
  4   |    -0.5   |    2.955   |    7.182
  5   |    -0.4   |    1.405   |    3.132
  6   |    -0.1   |    1.141   |    1.992
Writing output ... done.

```

Obrázek 19: Výsledek dokování v programu AutoDock Vina

V dalším kroku následoval výběr ligandů vhodných pro dokování. Ligandy byly vybrány pomocí ligandových databází, zejména DrugBank. Zde došlo k hledání steroidních struktur, které by strukturně a hmotnostně zhruba odpovídaly původním ligandům. DrugBank nabízí možnost najít podobné struktury. Tato databáze také nabízí možnost nakreslení samotné struktury, podle které najde shodné, nebo podobné ligandy. Takto bylo nalezeno prvních dvacet dva ligandů. Ty byly následně nakresleny pomocí programu MarvinSketch verze 22.19. Ligand byl nejdříve vymodelován ve 2D struktuře, převeden do struktury 3D potřebné pro dokování a pro kontrolu ještě zobrazen v PyMOLu.

Následně již byla potřeba jen ligandy připravit v AutoDock Tools jako .pdbqt struktury stejně jako při zpětném dokování. Receptory již nebyla potřeba připravovat, jelikož byly nachystané z předešlého kroku. Těchto 22 ligandů bylo do každého receptoru dokováno manuálně jeden po druhém.

Po proběhnutí dokování došlo k zobrazení ligandů v daných receptorech v PyMOLU. Zde se porovnály prostorové orientace jednotlivých struktur v aktivním místě proteinu. Porovnávání probíhalo vždy oproti orientaci původního ligandu. Dále byla porovnávána vazebné energie – čím větší záporné číslo afinity, tím silněji se struktura do komplexu váže. Porovnávání probíhalo opět oproti původnímu ligandu.

Nakonec byla pro každý receptor a nadokovaných 22 ligandů vytvořena tabulka se srovnáním všech vazebných energií pro porovnání mezi sebou a srovnání oproti původnímu ligandu.

Po konzultaci s vedoucím bakalářské práce bylo v databázi vybráno dalších 140 ligandů, které byly podobné ligandům původním. Opět byla potřeba ligandy připravit na dokování jako .pdbqt soubory. V tomto případě nebyl použit program AutoDock Tools, ale skript předem připravený vedoucím mé práce. Tato část experimentu se uskutečnila na univerzitním clusteru Ingwe. Pomocí programu WINSXP byly do vytvořené složky na clusteru zkopírovány dané ligandy. Pro přístup do clusteru se použil program PuTTY sloužící k propojení s jinými zařízeními v prostředí Linuxu. Následně došlo ke spuštění skriptu *prepare-ligand.sh* a skript připravil všechny struktury ve formátu .pdbqt.

I dokování proběhlo pomocí skriptu, tentokrát na jiném univerzitním clusteru – Melian. Zde byly opět struktury žádoucí pro experiment převedeny pomocí programu WINSXP do složek receptors a ligands. Následně přišla na řadu nutnost skript upravit pomocí příkazu nano. Zde došlo k nastavení velikosti gridu a souřadnice aktivního místa. Po uložení údajů byla potřeba zkontrolovat dostupnost nodů. Byl vybrán ten, který byl momentálně volný. Následovalo již spuštění samotného dokovacího skriptu pomocí příkazu `qsub -q mq-8-2@m15.upol.cz -l mem=3000 ./docking-cross.sh`, kde mq-8-2@m15.upol.cz je název příslušného nodu. Dokování jednotlivých receptorů probíhalo v různých časových dotacích – nejkratší v rozmezí 2-3 hodin až několik dní.

Po dokončení dokování byl použit skript sloužící pro extrahování energií z výsledných složek souborů `for i in *.log; do echo -n $i" "; awk '/-----+/{getline; print $2}' $i;` Následovalo vytvoření tabulky s afinitami všech ligandů pro jednotlivé soubory a jejich seřazení dle nejvýhodnějších energií. Pro bakalářskou práci bylo vybráno 15 ligandů s nejvýhodnější energií.

Po dokončení dokování tohoto balíčku ligandů bylo stejným postupem znovu nadokováno původních 22 ligandů pomocí skriptu pro sjednocení výsledků.

Posledním krokem byl popis aktivních míst jednotlivých steroidních receptorů v okolí 5Å. Tento krok probíhal v PyMOLU, kde byl označen libovolný nadokovaný ligand a pomocí funkce `select actions around atoms` vintin 5Å označeny aminokyseliny. Tato selekce byla zobrazena v textovém souboru jako jednotlivá data, kde byly sepsány jednotlivé aminokyseliny, nebo jejich zbytky a jejich pořadí v proteinu. Následně byla vytvořena tabulka daného vazebného místa s jeho aminokyselinami a jejich pořadí v receptoru. Faktorem, který byl žádoucím byla polarita těchto aminokyselin a jejich ovlivnění vazby ligandů.

### 3. Výsledky a diskuze

V této části jsou zhodnoceny výsledky dokování celkem 162 ligandů do jednotlivých receptorů (progesteronový, androgenní, estrogenové, mineralokortikoidní a glukokortikoidní).

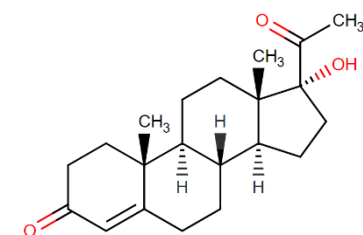
Byl vybrán soubor přibližně 15 ligandů u každého receptoru, které se navázaly do aktivních míst s nejlepší vazebnou energií, v ideálním případě s energií vyšší, než původní ligand.

#### 3.1 Progesteronový receptor

Původní ligand progesteronového receptoru (PDB ID 1A28) – progesteron, se navázal s energií -12,2 kcal/mol. Žádný z dále nadokovaných ligandů nepřesáhl tuto energii, v následující tabulce 2 jsou však seřazeny ligandy s nejvyššími energiemi ligandů dosažených dokováními.

Tabulka 2: Tabulka ligandů s nejvyšší afinitou vázané do progesteronového receptoru

ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>progesteron</b>	<b>-12,2</b>
hydroxyprogesterone	-11,5
medrysone	-11,4
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-11,3
1-androstenedione	-11,2
medrogestone	-11,2
nomegestrol	-11,2
meprednisone	-11,1
metenolone	-11
norgestrel	-11
prasterone	-11
anecortave	-10,9
methylestrenolone	-10,9
norethandrolone	-10,9
5-androstenedione	-10,8
ethynylestradiol	-10,8
gestonorone	-10,8
methylprednisone	-10,8
(1,2,6,7-3H)_Testosterone	-10,8

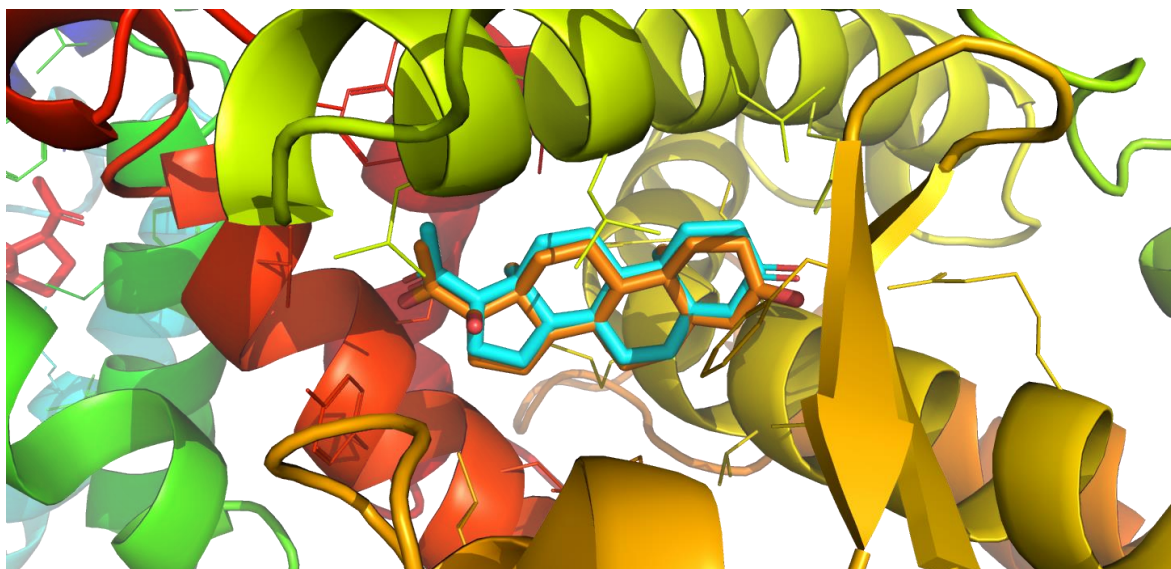


Obrázek 20 : Hydroxyprogesterone

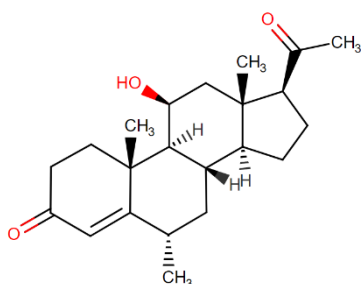
Nejlepší výsledek poskytl hydroxyprogesterone, struktura velmi podobná původnímu ligandu, která navíc obsahuje hydroxylovou skupinu. Tento ligand se navázal s vazebnou afinitou -11,5 kcal/mol. Hydroxyprogesteron je přirozený agonista progesteronového receptoru, dále také agonista mineralokortikoidního receptoru a částečný agonista

receptoru glukokortikoidního. Stejně jako progesteron se váže do aktivního místa polární vazbou na aminokyseliny glutamin 725 a arginin 766 [51].

Prostorová orientace oproti původnímu ligandu progesteronu je zobrazena na obrázku 21, kde hydroxyprogesteron je zobrazen oranžově a progesteron modře.



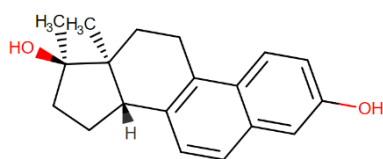
Obrázek 21: Zobrazení prostorové orientace hydroxyprogesteronu (oranžová) oproti progesteronu (modrá) v aktivním místě progesteronového receptoru



Obrázek 22: Medrysone

Druhou nejlepší energií, téměř totožnou s hydroxyprogesteronem se navázal medrysone. Jeho afinita činila  $-11,4$  kcal/mol. Strukturně je opět velmi podobný progesteronu, navíc obsahuje hydroxylovou skupinu na jedenáctém uhlíku a methylovou na šestém. Medrysone je protizánětlivý kortikoidní lék užívaný v optalmologii pro pacienty se zvýšeným očním tlakem [51].

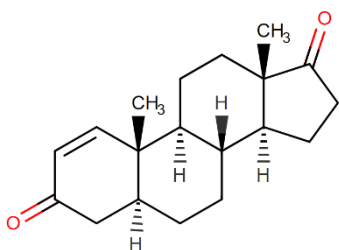
Stejně jako hydroxyprogesterone se váže do aktivního místa přes glutamin 725 a arginin 766. Navíc ještě hydroxylová skupina na jedenáctém uhlíku poskytuje polární vazbu s asparaginem 719.



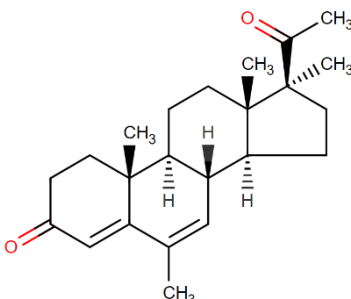
Obrázek 23: 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN

Třetí nejlepší výsledek poskytl 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN s afinitou  $-11,3$  kcal/mol. Tato struktura se od původního ligandu poměrně odlišuje. 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN je syntetický steroidní estrogen, který se nikdy nedostal na trh. Tento ligand se chová jako úplný agonista  $\alpha$ -estrogenu. Do aktivního místa progesteronového receptoru se váže polární vazbou na glutamin 725 a arginin 766 [51].

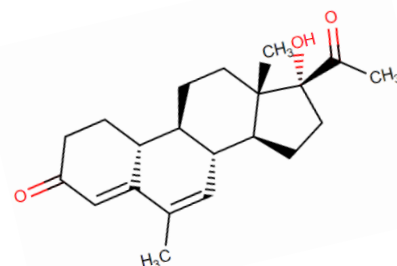
Se stejnou afinitu -11,2 kcal/mol se navázaly ligandy 1-androstenedione a dále medrogestone a nomegestrol .



Obrázek 24: 1-androstenedione



Obrázek 25: medrogestone

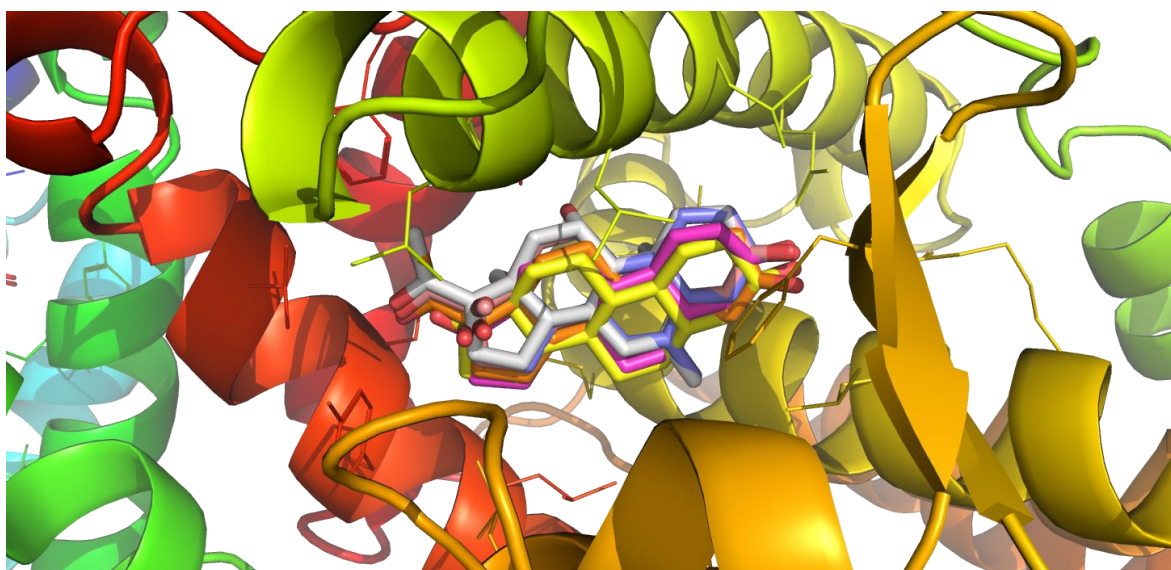


Obrázek 26: nomegestrol

1-androstenedione je syntetický anabolický steroid, podporuje maskulinní vzhled a má hluboký účinek na pokožku hlavy a ochlupení. Medrogestone je progestin využívaný jako přípravek na léčbu disfunkčního menstruačního krvácení a k léčbě odlupování endometria u žen v menopauze. Nomegestrol je steroidní progestin, je složkou nomegestrolu acetátu prodáváného jako progestin.

1-Androstenedione se váže do aktivního místa receptoru pomocí glutaminu 725 a argininu 766, stejně tak se váže i medrogestone a nomegestrol, ty navíc s threoninem 894 poskytují další polární vazbu [51].

Na obrázku 27 jsou zobrazeny prostorové orientace všech výše zmíněných ligandů, hydroxyprogesterone oranžově, 1-androstenedione růžově, 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN žlutě, medrogestone lososvě, medrysonu bíle a nomegestrol fialově. Původní ligand progesteron je zobrazen modře. Všechny tyto ligandy jsou shodně natočeny svou oxoskupinou, nebo v případě 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENINU hydroxyskupiny shodně s původním ligandem progesteronem. Všechny tyto ligandy se touto skupinou navíc váží shodně polární vazbou na glutamin 725 a arginin 766.



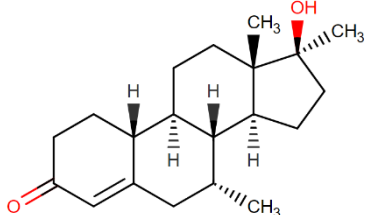
Obrázek 27: Zobrazení prostorové orientace ligandů do progesteronového receptoru

### 3.2 Androgenní receptor

Androgenní receptor (PDB ID 1e3g) přirozeně vázal ligand metribolone, díky jeho zpětnému dokování do receptoru byla získána jeho vazebná energie -11,7 kcal/mol. Opět nedošlo k přesahu energie žádným z alternativních ligandů, avšak energie nejlépe navázaných ligandů jsou seřazeny v tabulce 3 níže.

Tabulka 3: Energie nejlépe navázaných ligandů do androgenního receptoru

ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>metribolone</b>	<b>-11,7</b>
mibolone	-11,2
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-11,1
Fluoroestradiol_F-18	-11
19-nor-5-androstenedione	-10,8
methylestrenolone	-10,7
nandrolone	-10,7
norethandrolone	-10,5
18-methyl-19-nortestosterone	-10,2
trestolone	-10,1
steran	-10
1-androstenedione	-9,5
estradiol	-9,4
norgestrel	-9,4
ethynylestradiol	-9,2
nomegestrol	-9,1

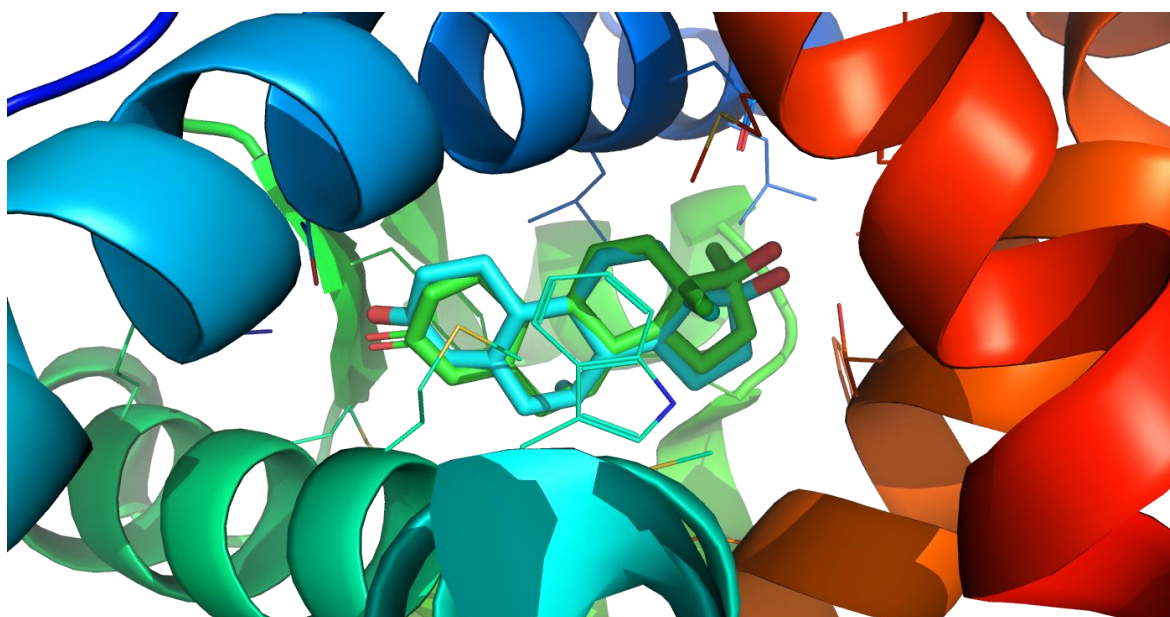


Obrázek 28: mibolone

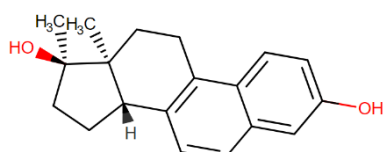
Jako nejlépe navázaný ligand se jeví mibolone s jeho afinitou -11,2 kcal/mol. Oproti původnímu ligandu metribolonu obsahuje navázanou methylovou skupinu na sedmém uhlíku. Mibolone je orálně podávaný lék pro ženy na prevenci říje a měl by mít větší afinitu k androgennímu receptoru, než metribolone (dle drug bank). Do aktivního místa androgenního receptoru se váže polární vazbou s asparaginem 705 a threoninem 877 jeho hydroxylovou skupinou. Jeho oxoskupina tvoří další polární vazbu s argininem 752 [51].

Na obrázku 28 je vyobrazena prostorová orientace mibolone (modře) oproti původnímu ligandu metribolonu (zeleně).



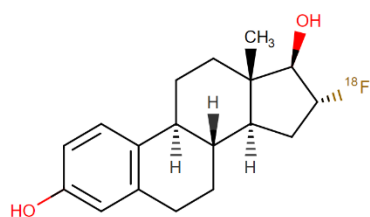


Obrázek 28: Prostorová orientace metribolonu a miboleronu v aktivním místě androgenního receptoru



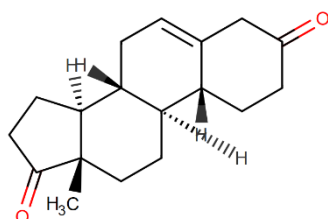
Obrázek 29: 17-METHYL-17-ALPHADIHYDROEQUILENIN

Druhý nejlépe navázaný ligand je 17-METHYL-17-ALPHADIHYDROEQUILENIN s energií -11,1 kcal/mol. Tento ligand se velmi dobře vázal i v případě progesteronového receptoru. Do androgenního receptoru se váže pomocí polární vazby s glutaminem 711 a argininem 752 jeho hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku [51].



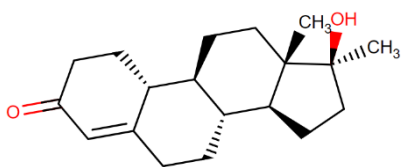
Obrázek 30: Fluoroestradiol F18

Třetím ligandem v pořadí s energií -11 kcal/mol je fluoroestradiol F18. Tato látka je užívána jako kontrastní činidlo při pozitronové emisní tomografii zobrazování estrogen receptor pozitivních lézí rakoviny prsu. Tento ligand obsahuje navázaný radioizotop fluoru - fluor 18. Do aktivního místa se navázal polární vazbou přes glutamin 711, arginin 752 a methionin 745 jeho hydroxylovou skupinou na třetím uhlíku [51].

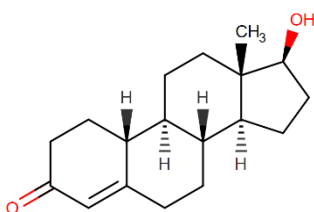


Obrázek 31: 19-nor-5-androstenedione

19-nor-androstenedione se navázal s energií -10,8 kcal/mol. Tento ligand je prozatím experimentální látka, která by mohla mít uplatnění v ovlivňování hladiny testosteronu v těle. Domnívá se, že tato látka by mohla pravděpodobně být metabolizována v těle a mohla aktivovat androgenní receptor, avšak v menší míře, než testosteron, nebo dihydrotestosteron. V aktivním místě androgenního receptoru je vázán na glutamin 711 a arginin 752 jeho oxoskupinou na třetím uhlíku [51].



Obrázek 32: Methylstrenolone



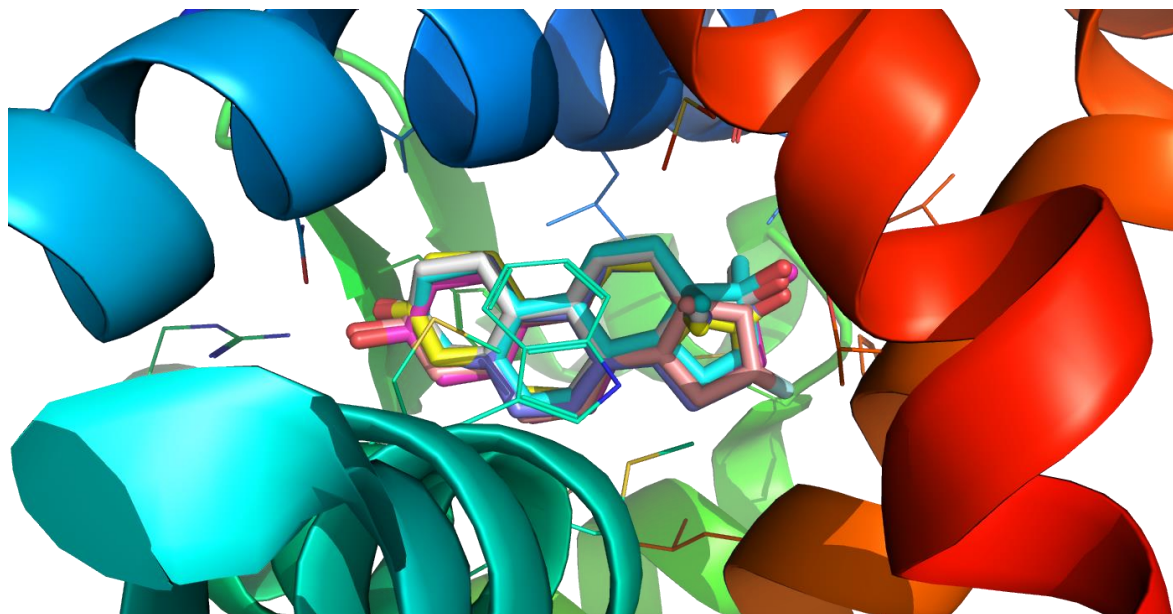
Obrázek 33: Nandrolone

Ligandy methylstrenolone a nandrolone se oba navázaly s energií -10,7 kcal/mol.

Methylstrenolone je progestin a anabolický steroid používaný k léčbě dysfunkcí menstruačního cyklu a menopauzy a lze jej označit za agonistu androgenního receptoru. V aktivním místě androgenního receptoru je navázán polární vazbou na threonin 877 jeho hydroxylovou skupinou. Pomocí oxoskupiny je navázán polární vazbou na glutamin 711, arginin 752 a velmi málo polární aminokyseliny fenylalanin 764 [51].

Nandrolone je anabolický steroid. Estery nandrolonu jsou dále používány v medicíně, ale pouze velmi málo. Do androgenního receptoru se stejně jako methylstrenolone vázal polární vazbou na threonin 877 hydroxylovou skupinou a oxoskupinou na arginin 752 a fenylalanin 764, k vazbě s glutaminem nedošlo [51].

Na obrázku 34 jsou vyobrazeny prostorové orientace jednotlivých ligandů – mibolone modře, 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN růžově, 19-nor-androstenedione žlutě, fluoroestradiol F18 lososově, methylstrenolone bíle a nandrolone fialově. U všech ligandů došlo k polární vazbě přes oxoskupinu nebo hydroxyskupinu třetího uhlíku na arginin 752 a kromě nandrolonu a miboleronu také na glutamin 711. K polárním vazbám přispěly také threonin 877, fenylalanin 764 a asparagin 705.



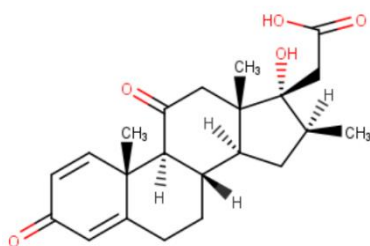
Obrázek 34: Prostorové orientace ligandů v aktivním místě androgenního receptoru

### 3.3 Glukokortikoidní receptor

U glukokortikoidního receptoru (PDB ID 6nwk) se také nepodařilo dosáhnout vyšší vazebné energie, než měl původní ligand – dexamethasone, který se navázal s vazebnou energií -12,7 kcal/mol. Nejlepší dosažené výsledky jsou seřazeny v tabulce 4 níže.

Tabulka 4: Nejlepší vazebné afinity ligandů dokovaných do glukokortikoidního receptoru

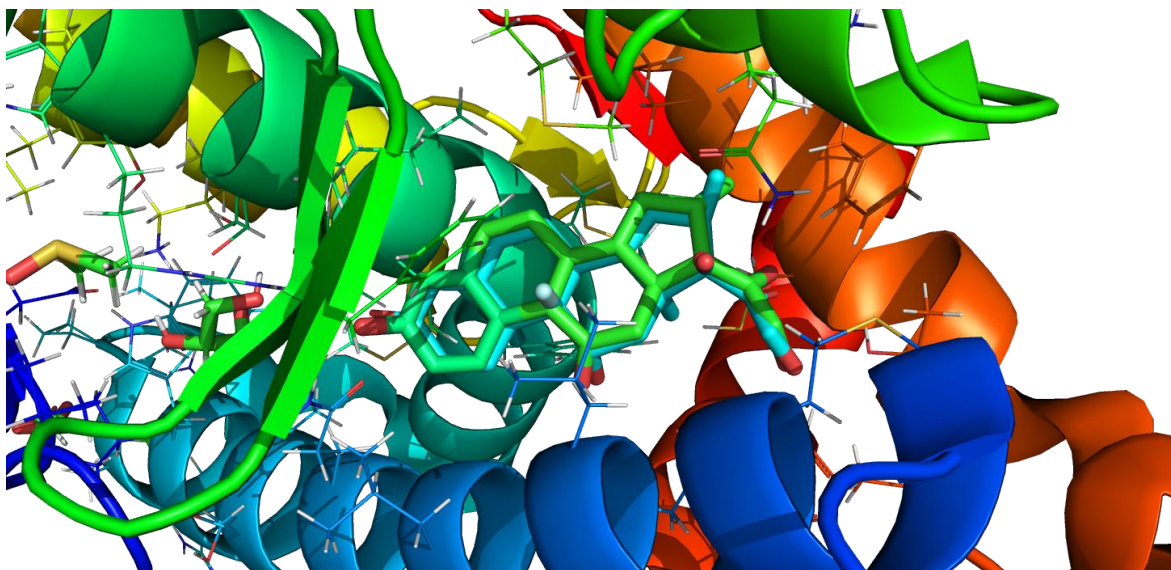
ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>dexamethasone</b>	<b>-12,7</b>
meprednisone	-12,5
betamethasone	-12,3
melengestrol	-12,3
vamolorone	-12,3
methylprednisone	-11,9
hydroxyprogesterone	-11,7
boldione	-11,6
fluocinolone	-11,6
halometasone	-11,5
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-11,3
boldenone	-11,3
calusterone	-11,3
corticosterone	-11,3
fluperolone	-11,3
gestonorone	-11,3
prednylidene	-11,3



Obrázek 35: Meprednisone

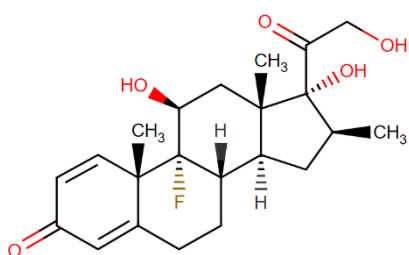
S vazebnou energií -12,5 kcal/mol je meprednisone ligand s nejlepší vazebnou energií pro glukokortikoidní receptor. Jedná se methylovaný derivát prednisonu. Svou oxoskupinou na třetím uhlíku se váže do aktivního místa glukokortikoidního receptoru polární vazbou na arginin 80. Oxoskupinou na jedenáctém uhlíku se polárně váže na asparagin 33 a leucin 32. Hydroxyskupinou na sedmnáctém uhlíku se polárně váže na glutamin 111, asparagin 33 a mehionin 29 [51].

Na obrázku 36 je zobrazena nadokovaná orientace meprednisonu (zeleně) oproti původnímu ligandu dexamethasonu (modře).



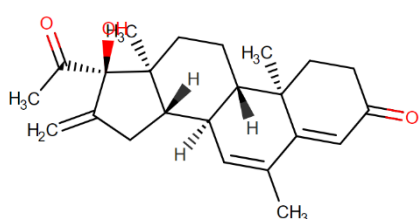
Obrázek 36: Prostorová orientace meprednisonu oproti původnímu ligandu dexamethasonu v aktivním místě glukokortikoidního receptoru

Ligandy betamethasone, melengestrol a vamolorone se navázaly shodně s vazebnou energií -12,3 kcal/mol.



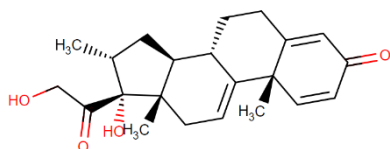
Obrázek 37: Betamethasone

Betamethasone je kortikosteroid užívaný jako imunosupresivum a protizánětlivá substance. Může být využit k léčbě kožních a autoimunní poruchy. V glukokortikoidním receptoru vykazuje polární vazby s argininem 33 hydroxylovou i oxoskupinou na postranním řetězci sedmnáctého uhlíku. Hydroxyskupina jedenáctého uhlíku se váže na leucin 32 a oxoskupina na třetím uhlíku se váže na glutamin 39 a argininem 80 [51].



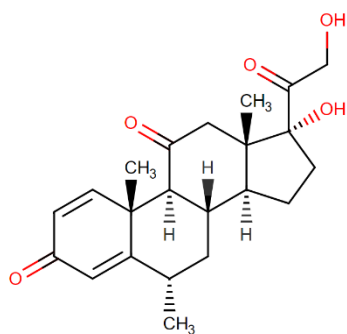
Obrázek 38: Melengestrol

Melengestrol je steroidní progestin a antineoplastická látka. Do receptoru se navázal polární vazbou na arginin 80 a glutamin 39 oxoskupinou na třetím uhlíku. Dále poskytuje vazbu s glutamimnem 111 hydroxylovou skupinou na patnáctém uhlíku [51].



Obrázek 39: Vamorolone

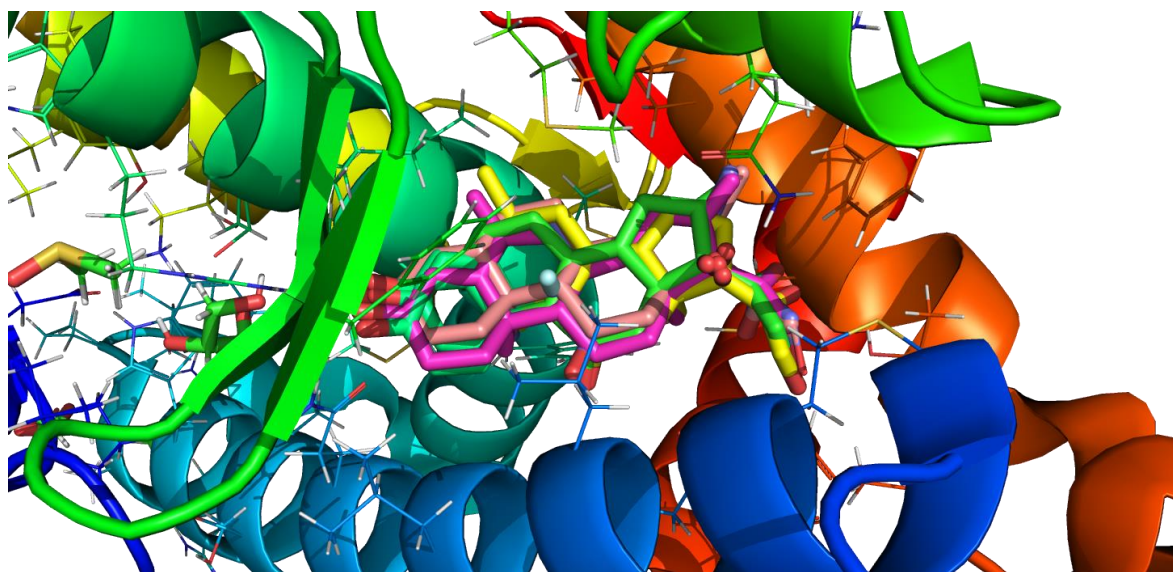
Vamorolone je syntetický steroid momentálně v klinickém testování pro chlapce s Duchennovou svalovou dystrofií. Jeho polární vazby v glukokortikoidním receptoru jsou realizovány hydroxylovou a oxoskupinou postranního řetězce na 17 uhlíku na arginin 33. Samostatná hydroxylová skupina sedmnáctého uhlíku se váže na glutamin 111 a oxoskupina na třetím uhlíku se váže na glutamin 39 a arginin 80 [51].



Obrázek 40: Methylprednisone

Pátým ligandem s nejvyšší afinitou k aktivnímu místu glukokortikoidního receptoru je methylprednisone s vazebnou energií -11,9 kcal/mol. Tato látka byla při studování léčby leukémie, revmatoidní artritidy, transplantaci ledvin a dalších. Do aktivního místa glukokortikoidního receptoru se methylprednisone navázal polární vazbou jeho hydroxylovou a oxoskupinou postranního řetězce na sedmnáctém uhlíku přes arginin 33 a threonin 208. Polární vazbu také poskytuje samostatná hydroxylová skupina sedmnáctého uhlíku s glutaminem 111. Oxoskupina na jedenáctém uhlíku se polárně váže s asparaginem 33 a leucinem 32. Navíc se oxoskupina třetího uhlíku váže s argininem 80 a glutaminem 39 [51].

Na obrázku 41 jsou zobrazeny prostorové orientace ligandů meprednisone zeleně, betamethasone fialově, vamorolone lososově, methylprednisone žlutě a melengestrol růžově. Hlavní roli hrají při vazbě ligand do aktivního místa aminokyseliny glutamin 111 a 39 a asparagin 33 a 80. Všechny ligandy s vysokou vazebnou afinitou mají velmi podobnou strukturu. Některé struktury navíc obsahují jiné funkční skupiny jako fluor (betamethasone) nebo více nebo méně methylových nebo hydroxyskupin, v zásadě je ale jejich struktura velmi podobná.



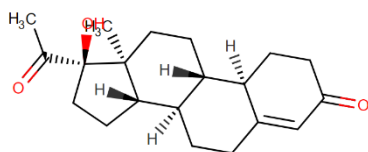
Obrázek 41: Prostorová orientace ligandů v aktivním místě glukokortikoidního receptoru

### 3.4 Mineralokortikoidní receptor

Původní ligand mineralokortikoidního receptoru (PDB ID 1y9r) deoxycorticosterone se navázal s vazebnou energií -10,2 kcal/mol. U několika ligandů došlo k převýšení vazebné energie. Tyto ligandy jsou zaneseny v tabulce 5.

Tabulka 5: Ligandy s nejlepší vazebnou energií dokované do mineralokortikoidního receptoru

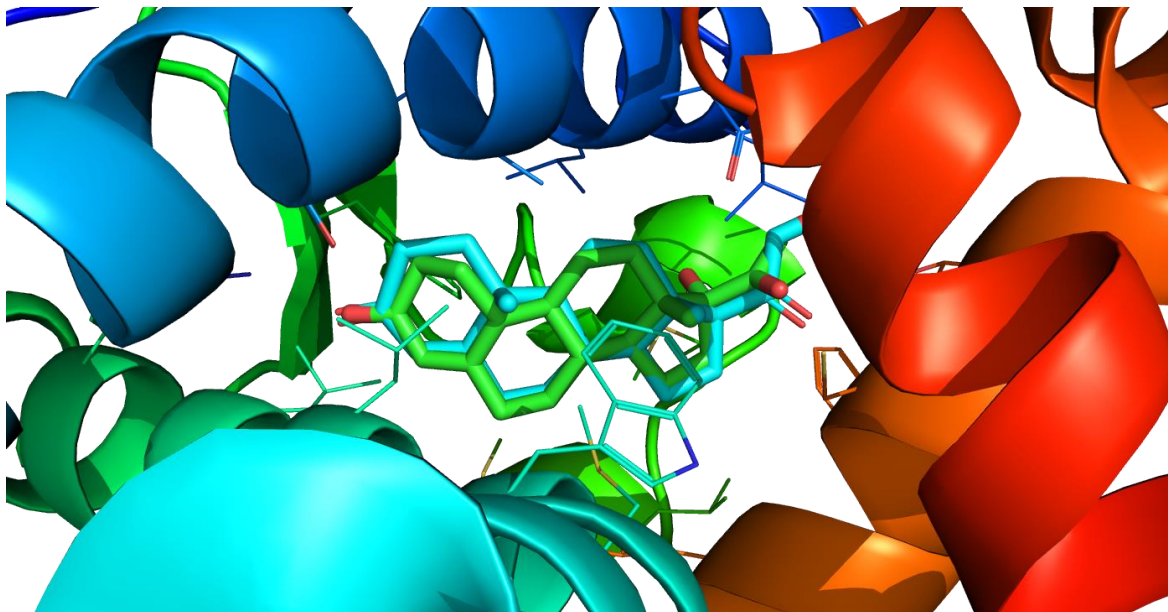
ligand	afinita (kcal/mol)
<b>deoxycorticosterone</b>	<b>-10,2</b>
gestonorone	-11
hydroxyprogesterone	-10,9
norgestrel	-10,7
anecortave	-10,6
(1,2,6,7-3H) Testosterone	-10,5
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-10,5
metenolone	-10,5
methylestrenolone	-10,5
progesteron	-10,5
testosterone	-10,5
1-androstenedione	-10,4
5-androstenedione	-10,4
bolasterone	-10,4
prasterone	-10,4
boldenone	-10,3
boldione	-10,3
mibolerone	-10,3
norethandrolone	-10,3



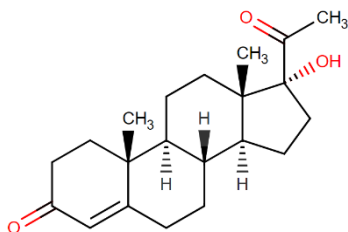
Obrázek 42 : Gestonorone

S vazebnou energií -11 kcal/mol je gestonorone nejlépe se vázající ligand z dokovaného souboru ligandů pro mineralokortikoidní receptor. Do aktivního místa receptoru se vázal polární vazbou na arginin 770 oxoskupinou postranního řetězce, dále oxoskupinou třetího uhlíku na arginin 817 [51].

Vazebná orientace je naznačena na obrázku 43, kde je zeleně gestonorone a modře původní ligand deoxykortikosterone.

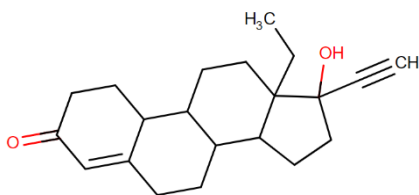


Obrázek 43: Vazba gestonorone a původního ligandu deoxycorticosteronu v aktivním místě



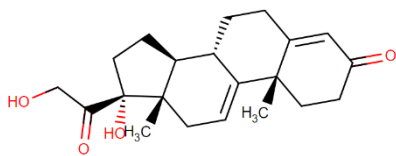
Obrázek 44: Hydroxyprogesterone

Druhým nejlépe navázaným ligandem je hydroxyprogesterone s vazebnou afinitou -10,9 kcal/mol. Tento ligand se také vyskytoval u progesteronového receptoru s největší vazebnou energií. Do mineralokortikoidního receptoru se polárně vázal na arginin 770 a threonin 945 jeho oxoskupinou postranního řetězce. Oxoskupinou třetího uhlíku se vázal polární vazbou na arginin 817, stejně jako ligand gestonorone [51].



Obrázek 45: Norgestrel

Dalším ligandem s vysokou energií je norgestrel s vazebnou afinitou -10,7 kcal/mol. Norgestrel se v kombinaci s ethinyl estradiolem používá jako forma hormonální antikoncepce žen. Do aktivního místa mineralokortikoidního receptoru se navázal polární vazbou přes oxoskupinu na arginin 817, glutamin 776 a leucin 810 [51].



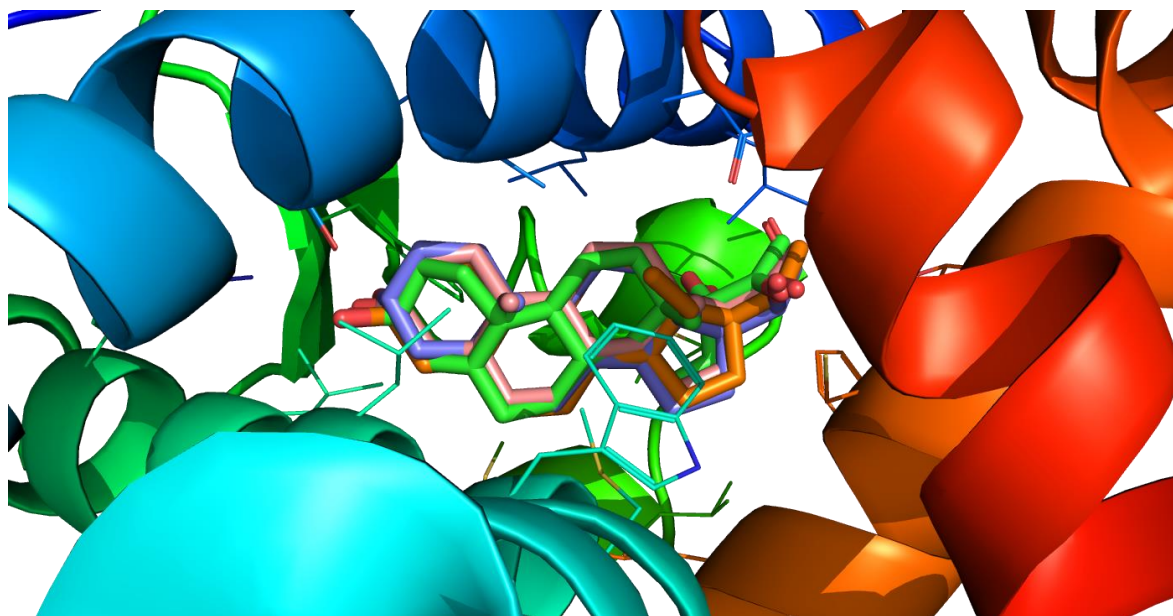
Obrázek 46: Anecortave

Ligand anecortave se do mineralokortikoidního receptoru vázal s vazebnou energií -10,6 kcal/mol. Tento ligand je v klinickém testování pro pacienty s oční hypertenzí a glaukomem s otevřeným úhlem. V aktivním místě mineralokortikoidního receptoru je vázán polárně hydroxylovou i oxoskupinou postranního řetězce na arginin 770 [51].

Se stejnou afinitou -10,5 kcal/mol se vázalo několik ligandů . Těmito látkami byly struktury (1,2,6,7 – 3H) testosterone, metenolone, methylestrenolone, progesteron, testosteron a 17-METHYL-17ALPHA-DIHYDROEQUILENIN. Methylestrenolone a , 17-METHYL-17ALPHA-DIHYDROEQUILENIN jsou ligandy vyskytující se s výhodnou vazbou také u výše zmíněných receptorů.

Ligandy se do aktivního místa mineralokortikoidního receptoru obecně váží polární vazbou zejména na arginin 770 a 817, některé ligandy dále také poskytují vazbu s threoninem 945 a glutaminem 776.

Na obrázku 47 jsou níže vyobrazeny vazby ligandů do aktivního místa receptoru. Zeleně gestonorone, hydroxyprogesterone lososově, anecortave fialově a norgestrel oranžově.



Obrázek 47: Ligandy vázané do aktivního místa mineralokortikoidního receptoru.



### 3.5 Estrogenový receptor

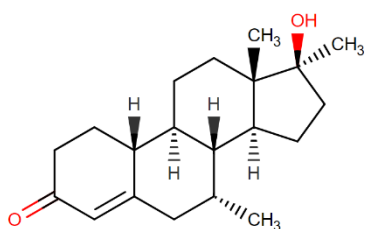
Jelikož má estrogenový receptor mnoho různých modifikací, byly pro jeho dokování vybrány čtyři struktury – estrogenový receptor alfa vázající estradiol (PDB ID 1A52), estrogenový receptor alfa vázající genistein (PDB ID 1X7R), estrogenový receptor alfa vázající 4-hydroxytamoxifen (PDB ID 3ERT) a estrogenový receptor beta vázající genistein (PDB ID 1X7J).

#### 3.5.1 Estrogenový receptor alfa vázající estradiol

Výsledky dokování u alfa estrogenového receptoru (PDB ID 1A52) s navázaným původním ligandem estradiolem s vazebnou afinitou -9,9 kcal/mol dosáhly převýšení energie původního ligandu sedmi ligandy. Nejlepší výsledky z dokovaných ligandů jsou zaneseny do tabulky 5.

Tabulka 6: Vazebné energie ligandů dokovaných do aktivního místa estrogenového receptoru

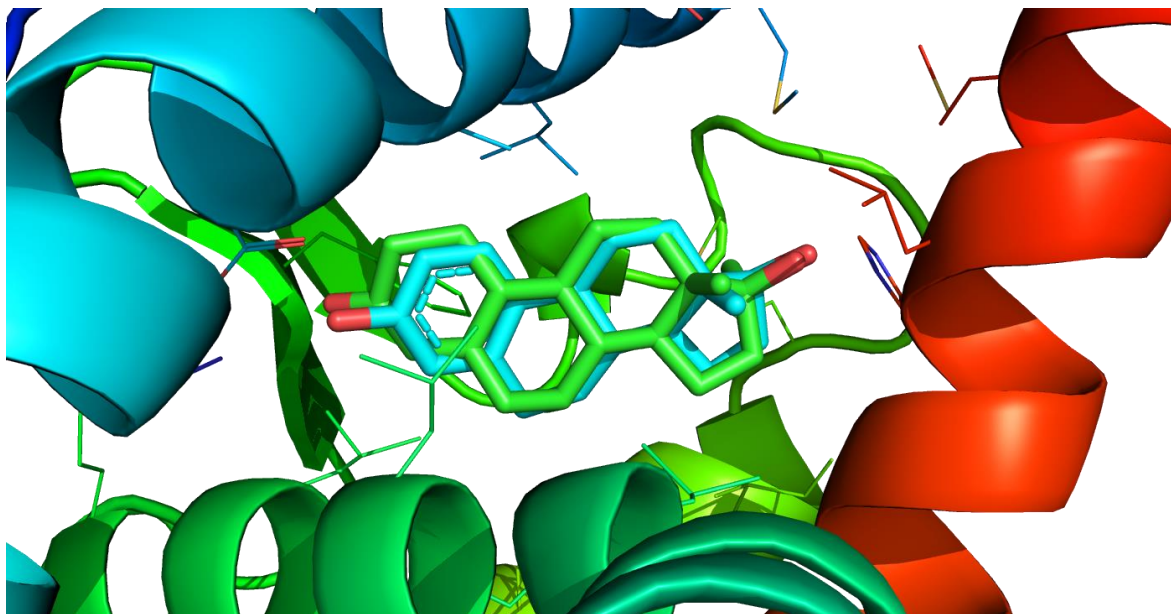
ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>estradiol</b>	<b>-9,9</b>
mibolerone	-10,5
19-nor-5-androstenedione	-10,4
equilenin	-10,4
Fluoroestradiol_F-18	-10,3
trestolone	-10,3
methylestrenolone	-10,2
18-methyl-19-nortestosteron	-10
boldione	-9,9
nandrolone	-9,9
norethandrolone	-9,9
5-androstenedione	-9,8
1-androstenedione	-9,6
boldenone	-9,6
gestonorone	-9,4
steran	-9,4



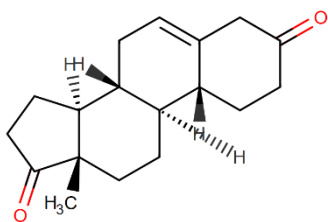
Obrázek 48: Mibolerone

Ligand mibolerone vychází z dokování jako nejlépe se vázající ligand stejně jako u androgenního receptoru. Do aktivního místa estrogenu se váže svou oxoskupinou na třetím uhlíku na fenylalanin 404 a arginin 394 narozdíl od původního ligandu estradiolu, který se jeho hydroxyskupinou na třetím uhlíku váže místo fenylalaninu na kyselinu glutamovou 353. Hydroxylovou skupinou se navíc váže na aminokyselinu histidin 524.

Prostorové navázání je naznačeno na obrázku 49, kde je mibolerone znázorněn zeleně a původní ligand estradiol modře [50].

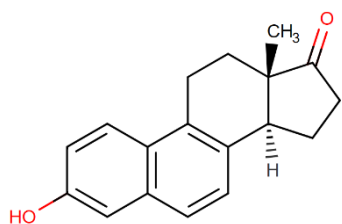


Obrázek 49: Prostorové navázání miboleronu oproti estradiolu v estrogením receptoru alfa vázající estradiol



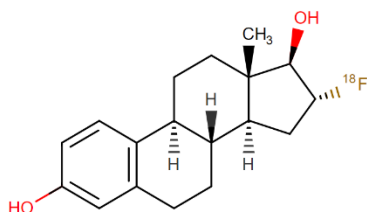
Obrázek 50: 19-nor-5-androstenedione

19-nor-5-androstenedione a equilenin se shodně navázaly s afinitou -10,4 kcal/mol. 19-nor-5-androstenedione je ligand, který při dokování vykazoal také dobrou afinitu k androgennímu receptoru. Do estrogenního receptoru se váže polárně jeho oxoskupinou třetího uhlíku na arginin 394 a oxoskupinou sedmnáctého uhlíku na histidin 524.



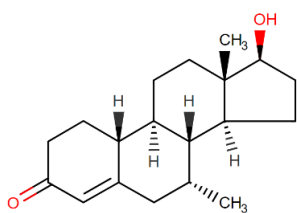
Obrázek 51: Equilenin

Equilenin je estrogení steroid produkovaný koňmi a můžeme ho ve zvýšené koncentraci najít v moči těhotných kobyl. V aktivním místě je polárně vázán pouze pomocí argininu 394 jeho hydroxylovou skupinou [51].



Obrázek 52: Fluoroestradiol F18

Dalšími ligandy převyšujícími energii původního ligandu s vazebnou afinitou -10,3 kcal/mol jsou Fluoroestradiol F18 a trestolone. Tento ligand s radioizotopem fluoru vykazoal vysokou hodnotu vazebné afinity také u androgenního receptoru, stejně jako trestolone. Hydroxylovou skupinou třetího uhlíku se polárně navázal hned na tři aminokyseliny – kyselinu glutamovou 353, leucin 387 a arginin 394. Hydroxylovou skupinou sedmnáctého uhlíku poskytuje polární vazbu s histidinem 524.



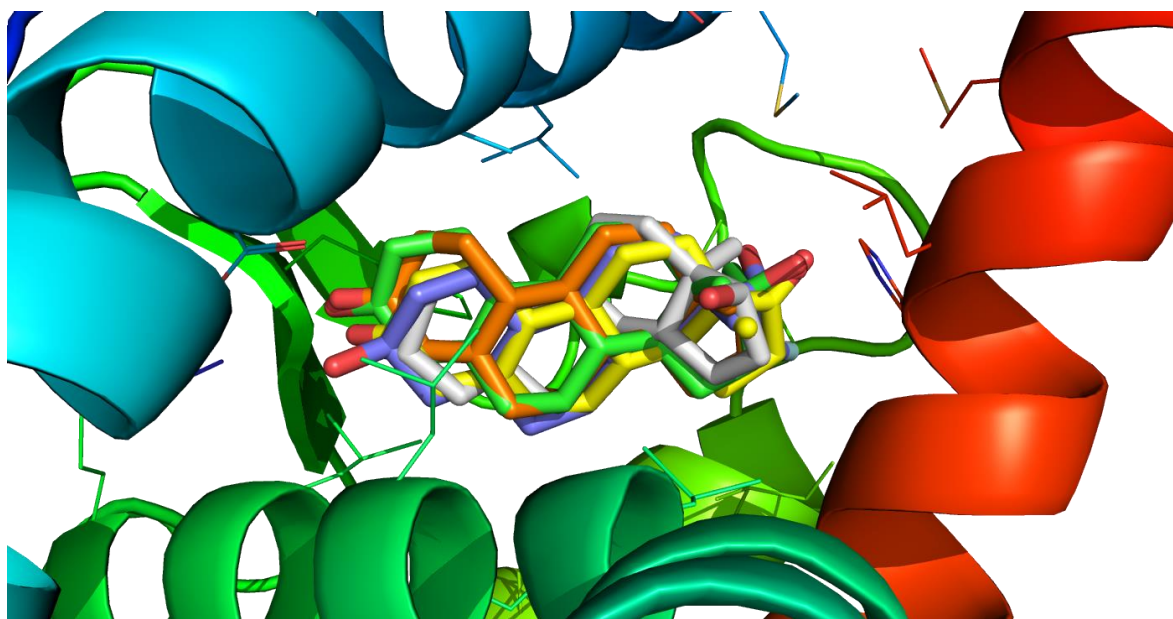
Obrázek 53: Trestolone

Trestolone je uměle syntetizovaná látka, která by mohla být potenciálním kandidátem jako antikoncepční pilulka pro muže, jeho působení zajišťuje dočasnou infertilitu. Hydroxylovou skupinou se v estrogením receptoru navázal na arginin 394 a kyselinu glutamovou 353. Oxoskupinou je polárně vázán s histidinem 524 [51].

Dalšími ligandy vázajícími se s vyšší vazebnou energií, než původní ligand estradiol jsou methylestrenolone a boldione.

Ligandy se do aktivního místa estrogenového receptoru alfa vázající estradiol vázaly pomocí následujících aminokyselin polární vazbou: kyselina glutamová 353, arginin 394 a svou skupinou na sedmnáctém uhlíku ve většině případů na histidin 524.

Na obrázku 54 jsou zobrazeny prostorové orientace ligandů v aktivním místě – mibolone zeleně, equilenin bíle, fluoroestradiol F18 fialově, trestolone oranžově a 19-nor-5-androstenedione žlutě.



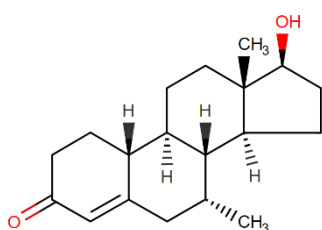
Obrázek 54: Prostorová orientace v aktivním místě ER alfa vázající estradiol

### 3.5.2 Estrogenový receptor alfa vázající genistein

Velmi zajímavých výsledků bylo dosaženo při dokování alfa estrogenního receptoru vázající genistein (PDB ID 1X7R). Celkem 47 ligandů ze souboru dokovaných ligandů dosáhly dokováním vyšší vazebné afinity, než původní ligand genistein s vazebnou afinitou -8 kcal/mol. V následující tabulce 7 jsou zaneseny ligandy s nejlepší dosaženou hodnotou vazebné afinity.

Tabulka 7: Nejlepší vazebné energie ligandů vázaných do estrogenového receptoru alfa vázaného s genisteinem

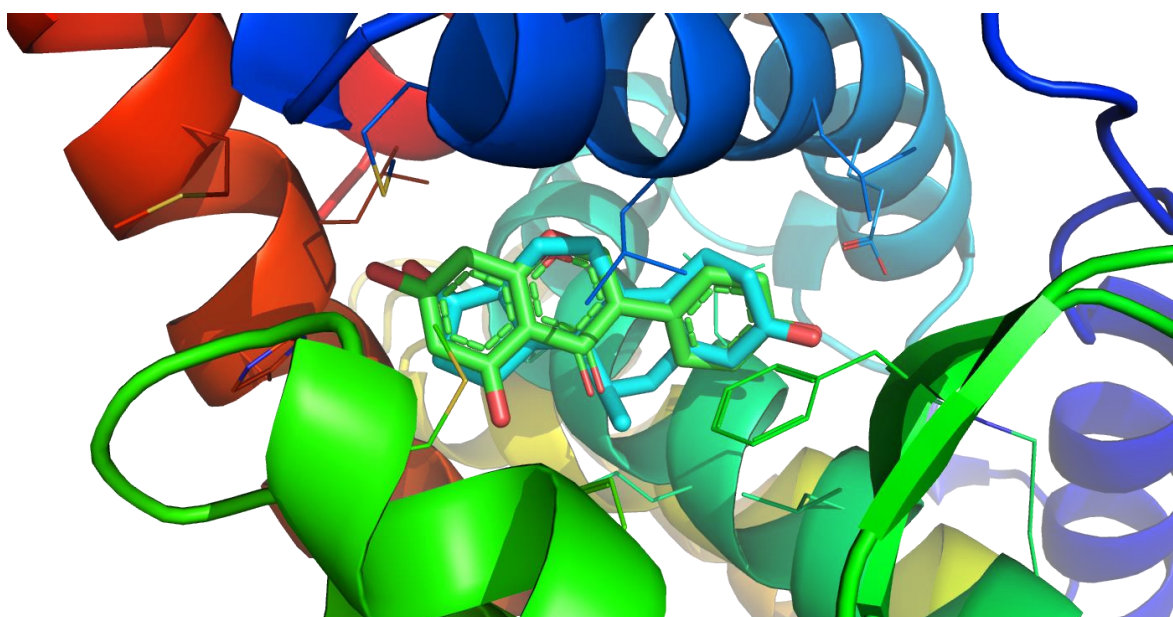
ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>genistein</b>	<b>-8</b>
trestolone	-10,9
estrone	-10,8
19-nor-5-androstenedione	-10,7
mibolone	-10,7
5-androstenedione	-10,6
1-androstenedione	-10,5
Fluoroestradiol_F-18	-10,3
etynodiol	-10,2
methylestrenolone	-10,1
nandrolone	-10,1
prasterone	-10
(1,2+A1:B115+A1:B145,6,7-3H)_Testosterone	-9,9
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-9,9
bolasterone	-9,9
boldenone	-9,9



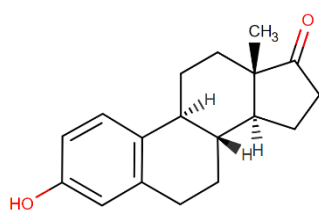
Obrázek 55: Trestolone

Ligandem s nejvyšší energií převyšující genistein je trestolone s vazebnou afinitou - 10,9 kcal/mol. Tento ligand dále také převyšoval vazebnou energii původního ligandu při dokování do estrogenového receptoru alfa vázaného s estradiolem. Svou oxoskupinou se váže v aktivním místě estrogenového receptoru polární vazbou na kyselinu glutamovou 353 a arginin 394. Hydroxylovou skupinou se dále váže polárně na histidin 524.

Na obrázku 56 je zobrazeno prostorové orientování trestolonu - růžově, oproti genisteinu - zeleně.

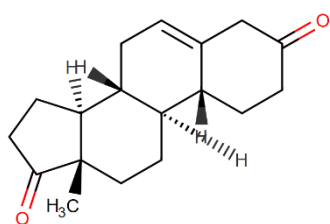


Obrázek 56: Prostorová orientace trestolonu oproti genisteinu v aktivním místě estrogenového receptoru alfa vázajícího genistein



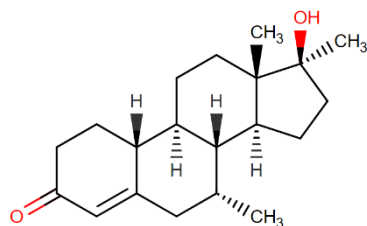
Obrázek 57: Estrone

Druhým nejlépe vázaným ligandem s energií - 10,8 kcal/mol je estrone. Estrone je jedním z hlavních savčích estrogenů produkovaný především vaječníky, placentou a adipózní tkání. Svou hydroxylovou skupinou je vázán v aktivním místě receptoru polární vazbou s kyselinou glutamovou 353 a argininem 394, oxoskupina polární vazbu neposkytuje [51].



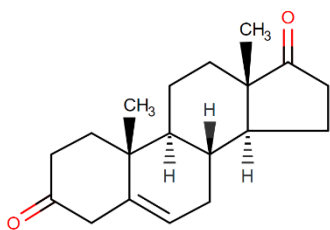
Obrázek 58: 19-nor-5-androstenedione

19-nor-5-androstenedione a mibolerone jsou ligandy vázající se do aktivního místa estrogenového receptoru s vazebnou afinitou -10,7 kcal/mol. Oba tyto ligandy byly také nejlépe navázanými také u estrogenového receptoru alfa vázaného s estradiolem. Látka Mibolerone byla navíc nejlépe vázaným ligandem u androgenního receptoru, 19-nor-5-androstenedione dále také vykazoval vysokou vazebnou energii u tohoto recetoru [51].



Obrázek 59: Mibolerone

19-nor-5-androstenedione se váže oxoskupinou třetího uhlíku do estrogenového receptoru polárně na arginin 394 a oxoskupinou sedmnáctého uhlíku na histidin 524, stejně jako u estrogenového receptoru vázaného s estradiolem. Mibolerone se v aktivním místě receptoru váže oxoskupinou na arginin 394 a kyselinu glutamovou 353 polárně. Hydroxyskupina tvoří vazbu s histidinem 524.

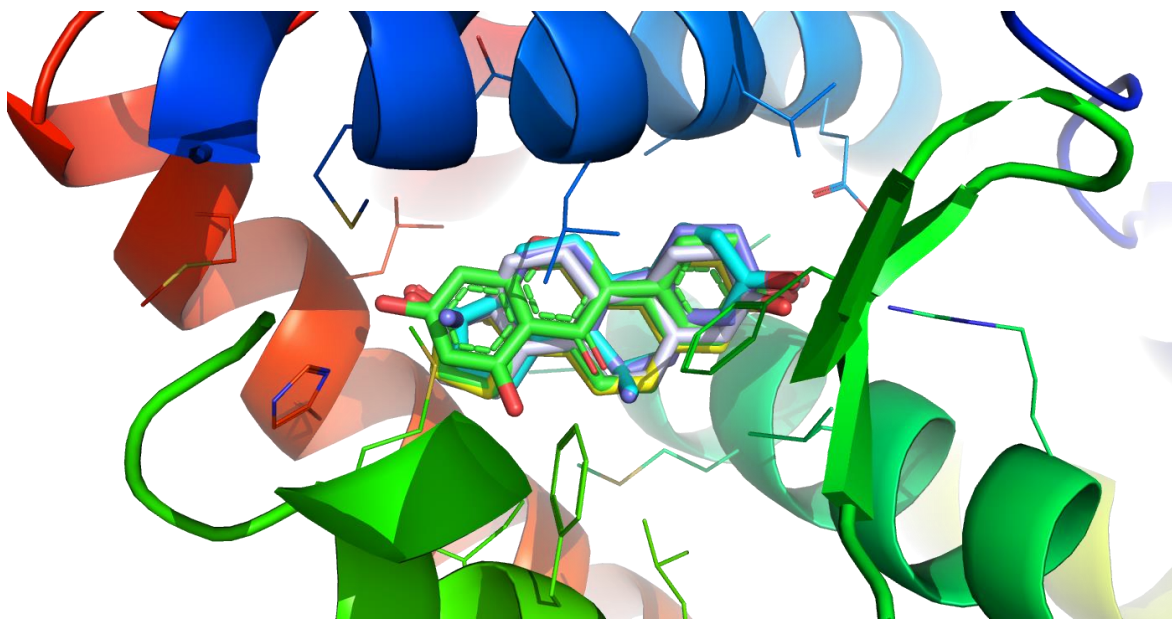


Obrázek 60: 5-androstenedione

5-androstenedione byl dokován do aktivního místa s vazebnou energií  $-10,6$  kcal/mol a je tak pátým nejlépe navázaným ligandem do tohoto receptoru. Tato látka je prohormon testosteronu používán jako zakázaná dopingová látka. V estrogením receptoru se v aktivním místě polárně váže na arginin 394 oxoskupinou třetího uhlíku a na histidin 524 oxoskupinou sedmnáctého uhlíku [51].

Stejně jako u estrogenového receptoru alfa vázajícího estradiol se ligandy do aktivního místa tohoto receptrou váží přes stejné aminokyseliny – histidin 524, arginin 394 a kyselinu glutamovou 353.

Na obrázku 60 jsou zobrazeny prostorové orientace ligandů v aktivním místě estrogenového receptoru alfa vázajícího genistein – trestolone modře, estrone zeleně, 19-nor-5-androstenedione žlutě, miboleronu fialově a 5-androstenedione bíle.



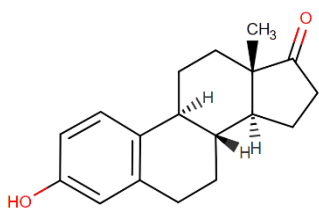
Obrázek 60: Prostorová orientace ligandů v aktivním místě estrogenového receptoru alfa vázající genistein

### 3.5.3 Estrogenový receptor beta vázající genistein

Při dokování estrogenového receptoru beta (PDB ID 1X7J) bylo také u několika ligandů dosaženo převýšení vazebné afinity jeho původního ligandu genisteinu s vazebnou afinitou -9,2 kcal/mol. Bylo dosaženo velmi podobných výsledků, jako u estrogenového receptoru alfa vázající ho se s genisteinem. Nejlepší dosažené výsledky jsou znázorněny v tabulce 8.

Tabulka 8: Nejlepší vazebné energie ligandů vázaných do aktivního místa estrogenového receptoru beta

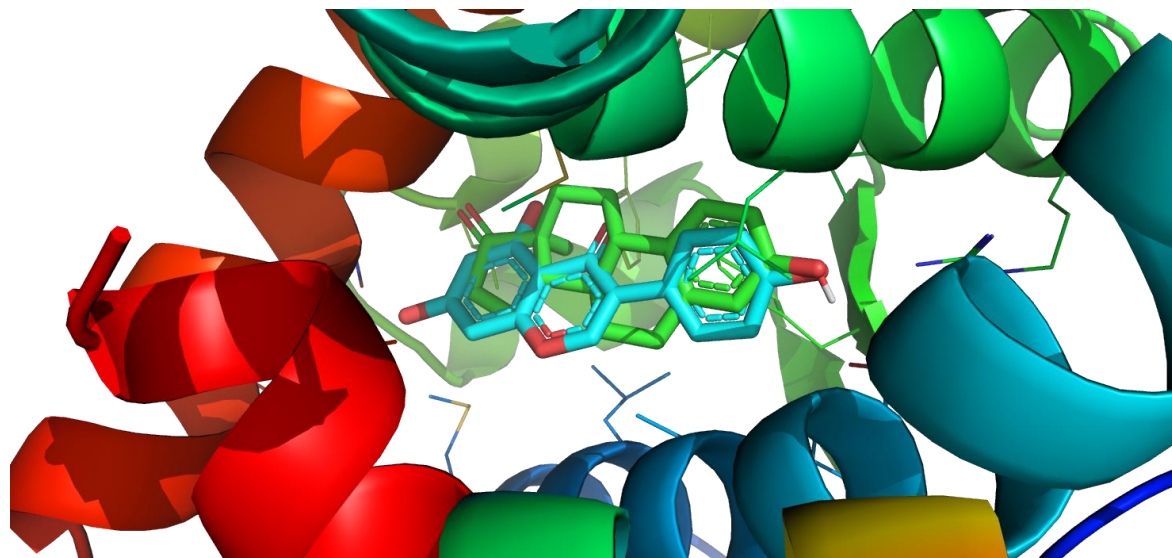
ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>genistein</b>	<b>-9,2</b>
estrone	-10,9
5-androstenedione	-10,6
19-nor-5-androstenedione	-10,2
steran	-10
etynodiol	-9,8
trestolone	-9,7
(1,2+A1:B145,6,7-3H)_Testosterone	-9,6
1-androstenedione	-9,6
calusterone	-9,6
nandrolone	-9,6
boldenone	-9,5
metenolone	-9,4
testosterone	-9,4
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	-9,3
boldione	-9,2
Fluoroestradiol_F-18	-9,1



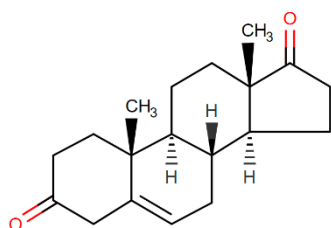
Obrázek 61: Estrone

Nejlépe navázaným ligandem v tomto steroidním receptoru s vazebnou energií -10,9 kcal/mol se jeví estrone, který byl druhým nejlépe vázaným ligandem také u estrogenového receptoru vázaného s genisteinem. Do aktivního místa estrogenového receptoru beta se vázal polárně na arginin 346 a kyselinu glutamovou 305 jeho hydroxylovou skupinou.

Na obrázku 62 je zobrazena vazba estrone (zeleně) oproti původnímu ligandu genisteinu (modře) v aktivním místě ER beta.

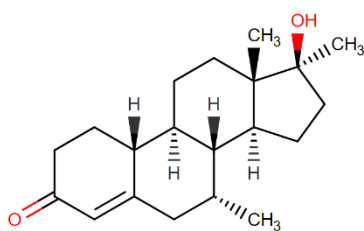


Obrázek 62: estrone a genistein v aktivním místě ER beta



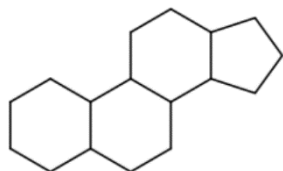
Obrázek 53: 5-androstenedione

Druhým nejlépe vázaným ligandem je 5-androstenedione s energií  $-10,6$  kcal/mol a stejně jako estrone, se se stejnou energií vázal i do estrogenového receptoru alfa s původním ligandem genisteinem. V aktivním místě estrogenového receptoru beta je polárně vázán kyslíkem třetího uhlíku s kyselinou glutamovou 305 a argininem 346 stejně jako estrone. Navíc ještě poskytuje polární vazbu na sedmnáctém uhlíku s histidinem 475.



Obrázek 64: 19-nor-5-androstenedione

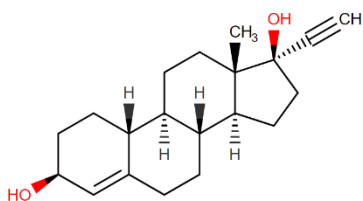
19-nor-5-androstenedione se po dokování navázal s vazebnou afinitou  $-10,2$  kcal/mol, tento ligand poskytoval také dobrou vazbu s estrogenovým receptorem alfa s genisteinem. V aktivním místě ER beta je vázán oxoskupinou polárně na arginin 346 a kyselinu glutamovou 304. Hydroxyskupinou je vázán polárně s histidinem 475.



Obrázek 65: Steran

Dobrou vazbu s afinitou  $-10$  kcal/mol poskytl také steran. Tato struktura je základní strukturou všech steroidních látek, které jsou z něho odvozeny. V aktivním místě receptoru neposkytuje žádnou polární vazbu.



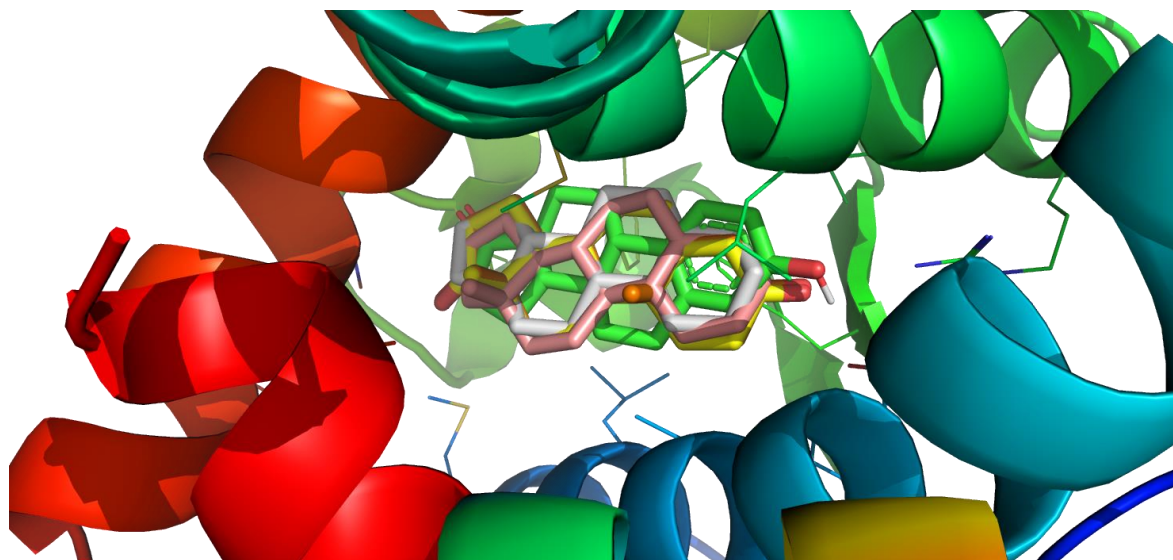


Obrázek 66: Etonodiol

S vazebnou afinitou  $-9,8$  kcal/mol byl navázán etynodiol. Etonodiol je steroidní progestin a je prekurzorem norethisteronu. V estrogenovém receptoru beta je vázán hydroxyskupinou na třetím uhlíku polární vazbou s kyselinou glutamovou 304, leucinem 339 a argininem 346. Hydroxyskupinou na sedmnáctém uhlíku tvoří polární vazbu s histidinem 475 [51].

Ligandy se do aktivního místa estrogenového receptoru beta vázaly polární vazbou zejména na arginin 346 a kyselinu glutamovou 304, svou skupinou na sedmnáctém uhlíku je většina ligandů vázána na histidin 475.

Na obrázku 67 je znázorněna vazba ligandů v aktivním místě beta estrogenového receptoru – estrone zeleně, 5-androstenedione oranžově, 19-nor-androstenedione žlutě, etynodiol lososově a steran bíle.



Obrázek 67: Navázané ligandy do aktivního místa estrogenového receptoru beta

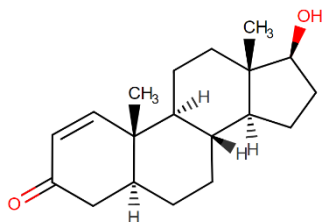
### 3.5.4 Estrogenový receptor alfa vázající 4-hydroxytamoxifen

U tohoto typu estrogenového receptoru (PDB ID 3ERT), jako jediného z použitých estrogenových receptorů, nedosáhl žádný ligand z vybraného souboru ligandů vyšší vazebné afinity, než původní ligand 4-hydroxytamoxifen, který se navázal s energií -9,6 kcal/mol. Toto je pravděpodobně způsobeno faktem, že 4-hydroxytamoxifen je inhibitor estrogenového receptoru a jeho navázáním do aktivního místa způsobuje jeho konformační změny. Nejlepší výsledky jsou zobrazeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Nejlepší vazebné energie ligandů vázaných do estrogenového receptoru alfa vázaného s 4-hydroxytamoxifenem

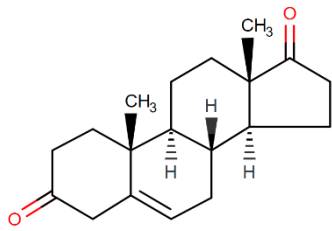
ligand	afinita/ (kcal/mol)
<b>4-hydroxytamoxifen</b>	<b>-9,6</b>
1-testosterone	-9,4
5-androstenedione	-9,4
bolasterone	-9,4
boldenone	-9,4
calusterone	-9,4
Estradiol benzoate	-9,4
1-androstenedione	-9,3
fulvestrant	-9,3
desogestrel	-9,2
estrone	-9,2
trestolone	-9,2
methyltestosterone	-9,1
mibolerone	-9,1
19-nor-5-androstenedione	-8,9
boldione	-8,9
estradiol	-8,9
estriol	-8,9
nandrolone	-8,9
prasterone	-8,9
testosterone	-8,9

Ligandy 1-testosterone, 5-androstenedione, bolasterone, boldenone, calusterone a estradiol benzoate se všechny navázaly se shodnou vazebnou afinitou -9,4 kcal/mol.



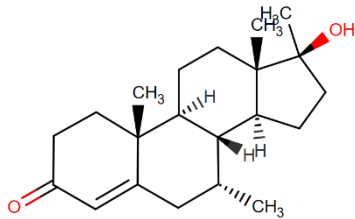
Obrázek 68: 1-testosterone

1-testosterone je anabolický steroid lišící se od testosteronu polohou dvojnás vazby a dá se charakterizovat jako anabolický steroid. Oxoskupinou se v aktivním místě váže polární vazbou na histidin a glycin 521. Hydroxyskupinou se polárně váže na arginin 394. Na obrázku 37 je zobrazena prostorová orientace 1-testosteronu (modře) oproti původnímu ligandu 4-hydroxytamoxifenu (zeleně) [51].



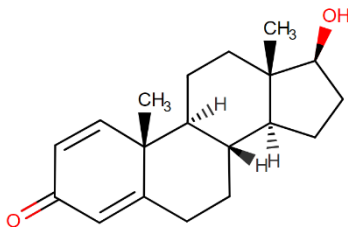
Obrázek 69: 5-androstenedione

5-androstenedione se vázal s vazebnou afinitou převyšující původní ligand také u estrogenových receptorů alfa i beta vázajících genistein. Oxoskupinou šestičetného kruhu se váže polárně s fenylalaninem 404 a arginnem 394, oxoskupinou pětičetného kruhu poskytuje vazbu s histidinem 524.



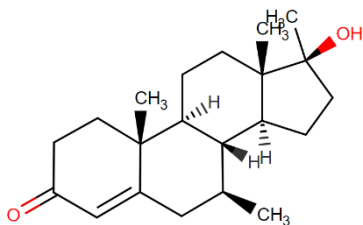
Obrázek 70: Bolasterone

Bolasterone je anabolický steroid a zakázaná dopingová substance. Využití se mu dostává zejména v oblasti veterinární medicíny. V aktivním místě estrogenového receptoru 3ERT je vázán polární vazbou na oxoskupině s histidinem 524 a kyselinou glutamovou 419. Hydroxyskupinou je vázán na arginin 394 [50].



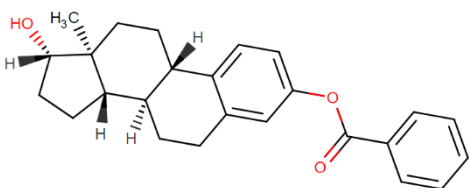
Obrázek 71: Boldenone

Boldenone je anabolický steroid používaný zejména pro veterinární účely a léčbu koní. U lidí se používá jako zakázaná dopingová substance. Do receptoru 3ERT je vázán hydroxyskupinou polární vazbou na leucin 387 a arginin 394 [50].



Obrázek 72: Calusterone

Calusterone je anabolický androgenní steroid a je antineoplastickou látkou. Dále je zakázanou dopingovou substancí. V aktivním místě estrogenového receptoru vázaného s molekulou 4-hydroxytamoxifenem je vázán oxoskupinou na kyselinu glutamovou 419 a histidin 524. Hydroxyskupina poskytuje vazbu s argininem 394 [51].

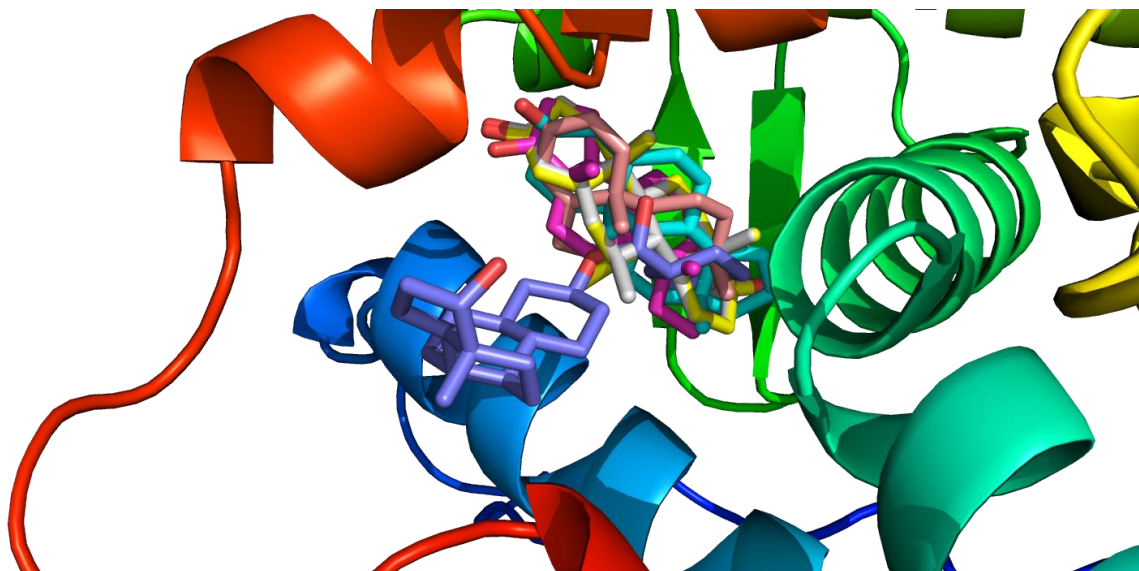


Obrázek 73: Estradiol benzoate

Estradiol benzoate je estrogen používaný pro léčbu nepravidelné menstruace. V aktivním místě receptoru 3ERT neposkytuje žádnou polární vazbu [51].

Ligandy v aktivním místě estrogenového receptoru alfa vázající 4-hydroxytamoxifen poskytovaly polární vazbu především s kyselinou glutamovou 419 histidinem 524 a argininem 394.

Na obrázku 74 je zobrazena prostorová orientace nejlépe navázaných ligandů v aktivním místě steroidního receptoru 3ERT 1-testosterone modře, 5-androstenedione růžově, bolasterone žlutě, boldenone lososově, calusterone bíle a estradiol benzoate fialově.



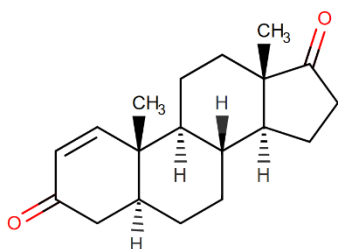
*Obrázek 74: Znázornění nejlépe navázaných ligandů do estrogenového receptoru alfa vázajícího 4-hydroxytamoxifen*

### 3.6 Celkové výsledky

Je možné si všimnout, že některé ligandy se poměrně často opakují v tabulkách ligandů s nejlépe vázanými ligandy jednotlivých receptorů. Tyto ligandy sice nemusí převyšovat vazebnou energii původního ligandu, ale byly zařazeny jako 15 ze 162 vázaných ligandů s nejlepší vazebnou energií u jednotlivých receptorů. Souhrnný přehled těchto ligandů a receptory, kde se vyskytují s výhodnou vazebnou energií, je zanesen do tabulky 10.

Tabulka 10: Souhrnná tabulka opakovaně vyskytujících se ligandů s výhodou vazebnou energií - PROG (progesteronový), AND (androgenní), GLU (glukokortikoidní), MIN (mineralokortikoidní), EST<sub>1</sub> α (estrogenový alfa + estradiol), EST<sub>2</sub> α (estrogenová alfa + genistein), EST<sub>3</sub> α (estrogenový alfa + 4-hydroxytamoxifen), EST β (estrogenový beta)

ligand	receptor							
	PROG	AND	GLU	MIN	EST <sub>1</sub> α	EST <sub>2</sub> α	EST <sub>3</sub> α	EST β
1-androstenedione	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓
17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN	✓	✓	✓	✓		✓		✓
5-androstenedione	✓			✓	✓	✓	✓	✓
boldenone			✓	✓	✓	✓	✓	✓
mibolerone		✓		✓	✓	✓	✓	
19-nor-5-androstenedione		✓			✓	✓	✓	✓
trestonolone		✓			✓	✓	✓	✓
nandrolone		✓			✓	✓	✓	✓
methylestrenolone	✓	✓	✓		✓		✓	
boldione			✓	✓	✓		✓	✓
prasterone	✓			✓	✓		✓	
norethandrolone	✓	✓		✓	✓			
gestonorone	✓		✓	✓	✓			
Fluororestradiol F18		✓			✓	✓		✓



Obrázek 75: 1-androstenedione

Jako ligand nejlépe se vázající do zmíněných receptorů se jeví 1-androstenedione, který se objevil v seznamu top 15 ligandů u všech receptorů kromě glukokortikoidního. Tento ligand je anabolický steroid, který je zakázán Světovou antidopingovou asociací jako zakázaná látka ve sportu.

Dalšími ligandy, o kterých lze říci, že se dobře vázaly do aktivních míst receptorů jsou 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN, 5-androstenedione a boldenone. Tyto látky se vázaly s dobrou vazebnou energií vázaly do šesti z osmi vybraných receptorů. Molekula 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN se nevyskytoval pouze u estrogenových receptorů alfa vázajících estradiol a 4-hydroxytamoxifen. 5-androstenedione se nevyskytoval u androgenního a glukokortikoidního a boldenone neposkytoval dobrou vazbu pouze s progesteronovým a androgenním receptorem. U dvou

z těchto látek, konkrétně u boldenone a 5-androstenedione – lze určit jako jejich společnou vlastnost používání jako zakázaná dopingová látka, 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN je syntetický steroidní estrogen. Dále tyto látky obsahují dvě methylové skupiny, boldenone a struktura s názvem 5-androstenedione na desátém a třináctém uhlíku, 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN na patnáctém a čtrnáctém.

Dále stojí za zmínku ligandy, které se vyskytovaly v nadpoloviční většině receptorů. Byly to ligandy mibolerone (androgenní, estrogenové receptory alfa vázající estradiol a dále genistein a 4-hydroxytamoxifen, mineralokortikoidní), 19-nor-5-androstenedione (všechny estrogenové receptory, androgenní), trestolone (všechny estrogenové receptory, androgenní), nandrolone (všechny estrogenové receptory a dále androgenní), methylestrenolone (progesteronový, glukokortikoidní, dále androgenní a estrogenové receptory alfa vázající estradiol a 4-hydroxytamoxifen) a boldione (glukokortikoidní, mineralokortikoidní, estrogenový receptor beta, estrogenové receptory alfa vázající estradiol a 4-hydroxytamoxifen). Tyto látky jsou označovány jako anabolické steroidy a většina je kontrolována Americkou antidopingovou asociací pro kontrolu zakázaných látek.

Ligandy, které se vyskytovaly u poloviny vybraných steroidních receptorů byly prasterone ( progesteronový, mineralokortikoidní, estrogenové receptory alfa vázající estradiol a 4-hydroxytamoxifen), norethandrolone (androgenní a mineralokortikoidní receptor, dále receptory progesteronový a estrogenový receptor alfa vázající estradiol), gestonorone (glukokortikoidní, mineralokortikoidní, progesteronový a dále estrogenový receptor alfa vázající estradiol), fluoroestradiol F18 (androgenní, estrogenový receptor beta, estrogenové receptory alfa vázající genistein a estradiol). Tyto látky se používají jako léky k různým léčebným účelům.

## 4. Závěr

Pomocí metody molekulového dokování bylo do aktivních míst steroidních receptorů (mineralokortikoidní, glukokortikoidní, progesteronové, androgenní a čtyři typy estrogenových receptorů) dokováno celkem 162 ligandů. Tyto ligandy se velikostí a strukturou podobaly původně vázaným molekulám v daných receptorech. Receptory byly stáhnuty z RCSB PDB databáze, došlo k identifikaci aktivního místa a přípravě receptorů pro dokování. Ligandy byly vybrány za pomoci databází Zinc a primárně DrugBank, následně překresleny v programu MarvinSketch a připraveny pro dokování. Samotné dokování probíhalo v programu AutoDock Vina za pomoci skriptu. Po dokončení dokování došlo k sestavení tabulek ligandů pro jednotlivé receptory a seřazení dle nejvýhodnějších vazebných afinit. Nejlepších patnáct ligandů u každého receptoru bylo porovnáno a vyhodnotily se souvislosti mezi vazbami jednotlivých molekul, které byly následně popsány pomocí polárních vazeb na aminokyseliny v aktivních místech receptorů.

Cílem práce bylo získat ligandy s vazebnou energií převyšující původní ligand. Této skutečnosti se nepodařilo dosáhnout u všech zmíněných receptorů. K tomuto jevu (převýšení vazebné energie původní látky) došlo u mineralokortikoidního receptoru, kde se nejlépe vázal gestonorone (-11 kcal/mol) s převýšením energie původního ligandu o -0,8 jednotky. Dále u estrogenového receptoru alfa vázajícího estradiol – nejlépe vázaný ligand mibolone (-10,5 kcal/mol) převýšil původní ligand estradiol o -0,6 jednotky. Tento jev se také podařilo identifikovat pro estrogenový receptor alfa vázající genistein (trestonolone -10,9 kcal/mol převýšil původního ligandu o -2,9 jednotky) a estrogenový receptor beta vázající genistein (estrone -10,9 kcal/mol – překročení původně vázaného ligandu o -1,7 jednotky). Lze si povšimnout, že mezi jednotlivými estrogenovými receptory je možné pozorovat zásadní změny ve vazbě ligandů – pravděpodobně z důvodu jiného aminokyselinového uspořádání.

Mezi receptory můžeme pozorovat, že některé ligandy figurují v tabulkách s nejlépe navázanými ligandy čteněji. Obecně lze říci, že nejlépe se vázajícím ligandem do vybraných receptorů je anabolický steroid 1-androstenedione, který prokázal výhodnou vazbu u všech receptorů s výjimkou glukokortikoidního. Dalšími látkami, které se vyskytují u nadpoloviční většiny receptorů jsou 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN, 5-androstenedione a boldenone. Dále se také vyskytuje mibolone, 19-nor-5-androstenedione, trestonolone, nandrolone, boldione a methylestrenolone. Všechny tyto látky až na výjimku (17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN) jsou anabolické steroidy a dopingové látky. Obecně lze tedy prohlásit, že nejčteněji se vyskytujícími ligandy s výhodnou vazebnou energií jsou anabolické steroidy.

Dále také stojí za zmínku ligandy, které se vyskytují s dobrou vazebnou energií u poloviny receptorů – fluoroestradiol F18, prasterone, norethandrolone a gestonorone. Tyto molekuly jsou využívány jako léky k rozličným účelům.

Výsledkem práce je soubor zhruba patnácti ligandů pro každý receptor s nejvýhodnějšími vazebnými energiemi. Tyto látky budou předloženy k dalším experimentům v rámci praktické chemie. Další souvislosti mezi ligandy a receptory budou nástrojem pro další navazující studium.

## 5. Summary

By using the molecular docking technique, there were 162 ligands docked into active sites of steroid receptors (mineralocorticoid, glucocorticoid, progesterone, androgene, and four types of estrogene receptors). These ligands were similar to ligands, that were bound naturally in these receptors. Receptors were downloaded from RCSB PDB database, active site was identified and these receptors were prepared for docking. Ligands were chosen with help of Zinc and Drugbank databases and then they were drawn in MarvinSketch and got prepared for docking. AutoDock Vina was used as docking programme. After molecular docking was finished, tables for each receptor were made including top fifteen ligands with the best binding energy. After that, those tables were compared to each other and binding affinities of these ligands were described by polar bonds to aminoacids in the receptor's active sites.

The goal of this thesis was to find ligands with binding energy, which would overcome the energy of the original molecule. This fact was not reached in all of the receptors. We could see this phenomenon in mineralocorticoid receptor, where the best bound ligand was gestonorone (-11 kcal/mol), who overcome the original ligand by -0,8unit. Then we could see it in estrogene receptor binding estradiol – best bound ligand mibolerone (-10,5 kcal/mol) overcame the original ligand estradiol by -0,6 unit. This fact (overcoming the energy of the original ligand) was also achieved for estrogene receptor alpha binding genistein (trestolone -10,9 kcal/mol), trestolone overcame genistein by -2,9 units. The last receptor, where overcoming the original ligand was achieved, was estrogene receptor beta binding molecule genistein (estrone -10,9 kcal/mol – overcoming the original ligand by -1,7 unit). It is clear, that there are differences in binding ligands to different estrogene receptors – probably because of the arrangement of aminoacids.

We can realise that there are structures, which appear in tables of more than one receptor. It can be generally said, that the best binding ligand to chosen receptor is 1-androstenedione, which bound with beneficial energy to all receptors except glucocorticoid receptor. Other ligands, that showed good binding affinity for most of the receptors were 17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN, 5-androstenedione and boldenone. There are also other ligands that were well bound for more than half of the receptors - mibolerone, 19-nor-5-androstenedione, trestonolone, nandrolone, boldione and methylestrenolone. All of these structures are anabolic steroids and substances used as doping (17-METHYL-17-ALPHA-DIHYDROEQUILENIN as an exception), so we can say that the best binding ligands to steroid receptors are anabolic steroids.

Ligands, that were bound with good binding energy in half of the receptors were fluoroestradiol F18, prasterone, norethandrolone a gestonorone. These substances are used for medical uses.

The result of this experiment is collection of approximately fifteen ligands for each receptor, which binded best out of those 162 ligands. These structures are going to be suggested for practical chemists to experiment with. Other connections and relations between these ligands and chosen receptors will be discussed in further study.



## Seznam použitých zdrojů

- [1] Berka, K.; Bazgier, V. *Racionální návrh léčiv pomocí in silico metod*, Univerzita Palackého v Olomouci **2015**, 76-88.
- [2] Fan, J.; Fu, A.; Zhang, L. Progress in Molecular Docking. *Quantitative Biology* **2019**, 7 (2), 83–89. <https://doi.org/10.1007/s40484-019-0172-y>.
- [3] Brooijmans, N.; Kuntz, I. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2003**, 32, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>.
- [4] Agarwal, S.; Mehrotra, R. Mini Review\_ An Overview of Molecular Docking. *JSM Chemistry* **2016**, (4)2, 1024–1028.
- [5] Brooijmans, N.; Kuntz, I. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **2003**, 32, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>.
- [6] Guedes, I. A.; de Magalhães, C. S.; Dardenne, L. E. Receptor–Ligand Molecular Docking. *Biophysical Reviews* **2014**, 6 (1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2>.
- [7] Jensen, J. H. *Molecular Modeling Basics*; CRC Press: Boca Raton, 2010. <https://doi.org/10.1201/9781420075274>
- [8] Till, M. S.; Ullmann, G. M. McVol - A Program for Calculating Protein Volumes and Identifying Cavities by a Monte Carlo Algorithm. *Journal of Molecular Modeling* **2010**, 16 (3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0541-y>.
- [9] Kaapro, A., & Ojanen, J. Protein docking **2002** <http://www.lce.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf>.
- [10] Li, J.; Fu, A.; Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdisciplinary Science: Computational Life Sciences* **2019**, 11 (2), 320–328. <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>
- [11] Huang, S.-Y.; Grinter, S. Z.; Zou, X. Scoring Functions and Their Evaluation Methods for Protein–Ligand Docking: Recent Advances and Future Directions. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12 (40), 12899. <https://doi.org/10.1039/c0cp00151a>.
- [12] Liu, J.; Wang, R. Classification of Current Scoring Functions. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2015**, 55 (3), 475–482. <https://doi.org/10.1021/ci500731a>.
- [13] Koes, D. R.; Baumgartner, M. P.; Camacho, C. J. Lessons Learned in Empirical Scoring with Smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *Journal of*

- Chemical Information and Modeling* **2013**, 53 (8), 1893–1904. <https://doi.org/10.1021/ci300604z>.
- [14] Šícho, M.; Svozil, D. Molekulové dokování jako nástroj pro virtuální návrh léčiv. *Chemické Listy* **2017**, 111 (11), 754–759.
- [15] Raha, K.; Merz, K. M. A Quantum Mechanics-Based Scoring Function: Study of Zinc Ion-Mediated Ligand Binding. *Journal of The American Chemical Society* **2004**, 126 (4), 1020–1021. <https://doi.org/10.1021/ja038496i>.
- [16] Cavasotto, C. N.; Aucar, M. G. High-Throughput Docking Using Quantum Mechanical Scoring. *Frontiers in Chemistry* **2020**, 8.
- [17] Simoncini, T.; Genazzani, A. Non-Genomic Actions of Sex Steroid Hormones. *European Journal of Endocrinology* **2003**, 148 (3), 281–292. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1480281>.
- [18] Taplin, M.-E.; Balk, S. P. Androgen Receptor: A Key Molecule in the Progression of Prostate Cancer to Hormone Independence. *Journal of Cellular Biochemistry* **2004**, 91 (3), 483–190. <https://doi.org/10.1002/jcb.10653>.
- [19] Levin, E. R.; Hammes, S. R. Nuclear Receptors Outside the Nucleus: Extranuclear Signalling by Steroid Receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2016**, 17 (12), 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>
- [20] Marinelli, M.; Piazza, P. V. Interaction between Glucocorticoid Hormones, Stress and Psychostimulant Drugs\*. *European Journal of Neuroscience* **2002**, 16 (3), 387–394. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02089.x>.
- [21] Schaaf, M. J. M.; Cidlowski, J. A. Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Action and Resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, 83 (1), 37–48. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00263-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00263-7).
- [22] Nicolaides, N. C.; Galata, Z.; Kino, T.; Chrousos, G. P.; Charmandari, E. The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. *Steroids* **2010**, 75 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.09.002>.
- [23] Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Research* **2018**, 46 (D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.
- [24] Davey, R. A.; Grossmann, M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev* **2016**, 37 (1), 3–15.

- [25] Gruber, C. J.; Tschugguel, W.; Schneeberger, C.; Huber, J. C. Production and Actions of Estrogens. *The New England Journal of Medicine* **2002**, *346* (5), 340–352. <https://doi.org/10.1056/NEJMra000471>.
- [26] Katzenellenbogen, B. S.; Choi, I.; Delage-Mourroux, R.; Ediger, T. R.; Martini, P. G. V.; Montano, M.; Sun, J.; Weis, K.; Katzenellenbogen, J. A. Molecular Mechanisms of Estrogen Action: Selective Ligands and Receptor Pharmacology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2000**, *74* (5), 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00104-7).
- [27] Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., DeMayo, F., Lydon, J. P., & O Malley, B. W. (2. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent progress in hormone research*, **2002**, *57*, 339-356.
- [28] Grimm, S. L.; Hartig, S. M.; Edwards, D. P. Progesterone receptor signaling mechanisms. *Journal of molecular biology* **2016**, *428* (19), 3831-3849.
- [29] Cole, T. J.; Short, K. L.; Hooper, S. B. The Science of Steroids. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **2019**, *24* (3), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>.
- [30] Mottram, D. R.; George, A. J. Anabolic Steroids. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2000**, *14* (1), 55–69. <https://doi.org/10.1053/beem.2000.0053>.
- [31] Kuhn, C. M. ,Anabolic steroids. *Recent progress in hormone research*, **2002**, *57*, 411-434.
- [32] Šimurka, P.; Zavřel, M. M., Anabolické steroidy a mládež. *Pediatric pro praxi*, 2008, 9.5: 294-297.
- [33] Fojtíková, L.; Göselová, S.; Holubová, B. Anabolické androgenní steroidy – nebezpečí v doplňcích stravy. *Chemické Listy* **2015**, *109* (12), 913–917.
- [34] Tiwari, R.; Köffel, R.; Schneiter, R. An Acetylation/Deacetylation Cycle Controls the Export of Sterols and Steroids from *S. Cerevisiae*. *The EMBO Journal* **2007**, *26* (24), 5109–5119. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601924>.
- [35] Drozdíková, E.; Obernauerová, M. Lipidy, funkčné a štruktúrne komponenty eukaryotických buniek. *Chemické Listy* **2015**, *109* (8), 600–605.
- [36] Dabbah-Assadi, F.; Handel, R.; Shamir, A. What We Know about the Role of Corticosteroids in Psychiatric Disorders; Evidence from Animal and Clinical Studies. *Journal of Psychiatric Research* **2022**, *155*, 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.09.032>.
- [37] Pajović, S.; Saičić, Z. Modulation of Antioxidant Enzyme Activities by Sexual Steroid Hormones. *Physiological Research* **2008**, 801–811. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931377>.

- [38] Beato, M. Steroid Hormone Receptors: An Update. *Human Reproduction Update* **2000**, 6 (3), 225–236. <https://doi.org/10.1093/humupd/6.3.225>.
- [39] Sierra, A.; Gottfried-Blackmore, A.; Milner, T. A.; McEwen, B. S.; Bulloch, K. Steroid Hormone Receptor Expression and Function in Microglia. *Glia* **2008**, 56 (6), 659–674. <https://doi.org/10.1002/glia.20644>.
- [40] Ingrová, P., Králík, M., Ruttkay-Nedecký, B., Kizek, R., & Zeman, T. Vliv steroidních hormonů na velikost lidské ruky: Pilotní studie. *Slovenská antropológia*, **2014**, 65.
- [41] Straub, R. H. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews* **2007**, 28 (5), 521–574. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0001>.
- [42] Nelson, L. R.; Bulun, S. E. Estrogen Production and Action. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2001**, 45 (3), S116–S124. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117432>.
- [43] Taraborrelli, S. Physiology, Production and Action of Progesterone. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* **2015**, 94 (S161), 8–16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>.
- [44] Graham, J. D.; Clarke, C. L. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues\*. *Endocrine Reviews* **1997**, 18 (4), 502–519. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308>.
- [45] Platz, E. A.; Leitzmann, M. F.; Rifai, N.; Kantoff, P. W.; Chen, Y.-C.; Stampfer, M. J.; Willett, W. C.; Giovannucci, E. Sex Steroid Hormones and the Androgen Receptor Gene CAG Repeat and Subsequent Risk of Prostate Cancer in the Prostate-Specific Antigen Era. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2005**, 14 (5), 1262–1269. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0371>.
- [46] Bagatell, C. J.; Bremner, W. J. Androgens in Men — Uses and Abuses. *New England Journal of Medicine* **1996**, 334 (11), 707–715. <https://doi.org/10.1056/NEJM199603143341107>.
- [47] Vondra, K.; Hampl, R., Glukokortikoidy a diabetes mellitus. *Vnitřní Lékařství* **2006**, 52 (5), 493-7
- [48] Rogerson, F. M.; Fuller, P. J. Mineralocorticoid Action. *Steroids* **2000**, 65 (2), 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(99\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(99)00087-2).
- [49] Irwin, J. J.; Tang, K. G.; Young, J.; Dandarchuluun, C.; Wong, B. R.; Khurelbaatar, M.; Moroz, Y. S.; Mayfield, J.; Sayle, R. A. ZINC20—A Free Ultralarge-Scale Chemical Database for Ligand Discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2020**, 60 (12), 6065–6073. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00675>.

- [50] Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* **2010**, *31*, 455 – 461.
- [51] Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46* (D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>.