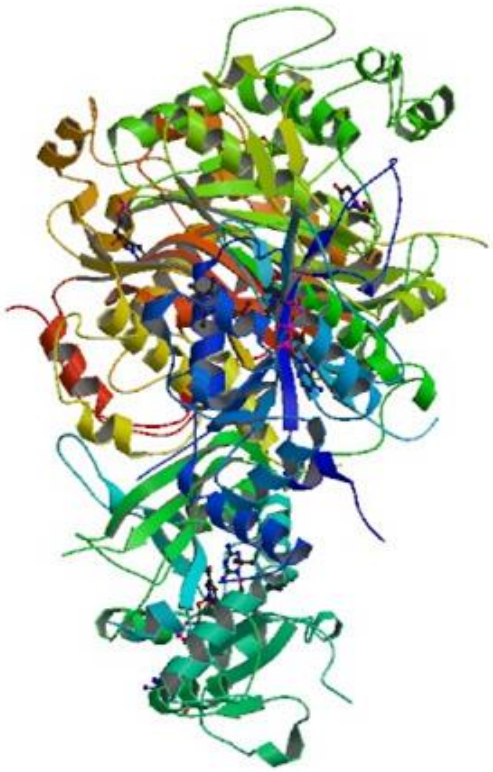
Integration of 3D Visualization and Molecular Interactions Using Molecular Modeling within the Context of Drug Development Against Malaria Disease for Learning in Chemistry Education.

Janske Bode | 3588661
Concept paper research project | 15 August 2016
Utrecht University



Research Project SEC:	30 ECTS
Supervisor:	dr. G. T. Prins (assistant professor) Freudenthal Institute for Science and Mathematics Education, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
Journal type:	International Journal of Science Education (IJSE)
Guidelines:	The journal bridges the gap between research and practice in science education. The journal comprises research that is relevant to educational practice, guided by educational realities in systems, schools, colleges and universities. Papers are conform APA style.
Audience:	Science Education researchers

Integration of 3D Visualization and Molecular Interactions Using Molecular Modeling within the Context of Drug Development Against Malaria Disease for Learning in Chemistry Education.

J. Bode, August 2016.

Abstract
Because of the introduction of Molecular Modeling (MM) as a new topic within science education, teaching students to use models and modeling has become more important. This study focuses on the integration of 3D visualization and molecular interactions using MM. A curriculum unit within the context of drug development against malaria disease is designed and implemented in Chemistry class. This study involves the analysis of three components of this curriculum unit: the motivational contribution of the context of drug development, the logical sequence of the expert approach and the integration of 3D visualization and molecular interactions. Data were collected using classroom observations, questionnaires, interviews, student presentations and written answers. Results show that both the context of drug development and the expert approach within the curriculum function to a sufficient extent to support this integration of 3D visualization and molecular interactions. Some adjustments are mentioned to improve the curriculum unit for implementation in class.

Keywords
Molecular Modeling, Context-based, Drug Development, Lead Optimization, Design Based Research.

Introduction

Models play a significant role in scientific research. Scientists use models to predict outcomes, guide inquiry, facilitate communication and justify results (Gilbert & Boulter, 1998). Models are the products and methods of science itself and therefore science and models are inseparable and intertwined with each other (Harrison & Treagust, 2000). This is supported by Frigg and Hartmann's statement that "models are one of the principal instruments of modern science" *(*Frigg & Hartman, 2006, para. 1).

But these principal instruments of science have a major importance in science education as well (Gobert, O'Dwyer, Horwitz, Buckley, Levy & Wilensky, 2011). Recent years have shown an increasing amount of research regarding the importance of models in science education (Franco et al, 1999; Gilbert & Boulter, 2000; Greca & Moreira, 2000). Models can help science educators to clarify and generate theories, phenomena or rules, and can explain or simplify abstract concepts (Dori & Barak, 2001). Without these models, teaching and learning science would be impossible.

Not only working with and understanding these models, also the process of constructing and generating these models are both considered integral parts of

scientific literacy (Gilbert & Boulter, 2012). Therefore, modeling is also part of the Dutch Chemistry curriculum (College van Examens, 2014). Teaching students to use models and modeling has become even more important because of the introduction of Molecular Modeling (MM) as a new topic within the Dutch Chemistry curriculum. MM involves the construction of molecular models on computers to make predictions about the behavior of these molecules. According to subdomain D4 of the Chemistry curriculum, Chemistry students are required to "write a reaction mechanism using 'molecular modeling' and, if applicable, to apply knowledge of catalysis within this modeling" in order to pass their Chemistry exam (College van Examens, 2014, Subdomain D4, translated by author).

Research shows that Computerized Molecular Modeling (CMM) has a positive effect on student's higher order questioning skills, research and modeling (Kaberman & Dori, 2009). MM has been found to be positively related to students' understanding and constructing new concepts in relation to chemical structures and bonding as well as to geometric and symbolic representation (Barnea & Dori, 1996). Moreover, students' attitudes towards the use of CMM were positive and they enjoyed using the CCM method (Barnea & Dori, 1999). Another study showed that students that managed to turn a 2D representation of a molecule into a model of a 3D structure got more insight into the relation between the structure and function of a molecule (Cody et al., 2012). Finally, after using MM, students were better able to move along the four different levels, which are present in chemistry education: symbolic, macroscopic, microscopic and process (Barak & Dori, 2004).

Even though Barak and Dori demonstrated improvement in moving along all four levels, the process level was only tested by students' completing and balancing chemical equations. But the process level comprises much more than that. It refers to how molecules interact with each other and this can only be explained using and combining all different chemistry levels at the same time (Dori and Sasson, 2013).

To our knowledge, no research exists addressing the integration of the interaction between molecules (i.e. process level) and 3D visualization using MM. Therefore, it is our aim to get more insight into the integration of 3D visualization and the interaction between molecules, using MM, and to add knowledge about how students both affectively and conceptually can be supported to use MM. Therefore, in the present study we evaluate and reflect on students' process of MM, using a designed curriculum unit within the context of drug development against malaria disease. A previous version of the curriculum unit has been studied in a pilot study before (Enckevort, 2014) and showed promising results. Yet, based on these results, the curriculum unit has been changed, including a major change in the approach of the curriculum unit to incorporate this integration of 3D visualization and the interaction between molecules.

Theoretical Framework

Even though MM can be applied to different areas of research, the focus of this present study will only be on MM in service of drug development. According to Schlick (2010, p. 3), MM is the "*science and art of studying molecular structure and*

function through model building and computations". Of course simple molecular models can be constructed using mechanical models or a pencil, paper and hand calculator. But as Leach (2001, p. 1) explains, MM nowadays is often associated with modeling using computer software. For example, Deepview[1] and Yasara[2] are two widely used computer tools which enable scientists to model molecules for scientific research. Ranging from very small molecules (like amino acids or some drugs) to very large biological molecules (like proteins or DNA molecules), MM can be used to analyze the structure and function of these molecules by modeling or imitating their behavior. For example, visualization, rotation and manipulation of molecules give more insight into molecules and their interactions (Oda & Takahashi, 2009).

The development of these and other MM computer tools took MM to a higher level. Hypotheses can be tested and developed, better understanding and extension of basic laws that govern molecular structure, flexibility and function can be inquired, and structural, dynamical and thermodynamic patterns of molecules can be explored (Leach, 2001). Algorithmic and computer-technological advances enable scientists to study and predict functions of more complex molecules and biological systems, which was not possible a couple of years ago.

But not only the complexity that can be studied has increased; MM can also serve as a solution to the labor intensive and expensive traditional methods in research. For example, cell-based screening is a traditional method of drug development that is used to test many different compounds on its effect on microorganisms or cells (Flannery, Chatterjee and Winzeler, 2013). This trial-and-error approach not only demands the testing of thousands of compounds, but when a specific compound is believed to have potential, hundreds of analogs of that compound must be developed in order to test and find the most effective and safe drug (Reddy & Parrill, 1999). This extensive process of testing compounds continues until researchers have found the best potential drug (a potential drug is also called 'lead'). However, MM has contributed to this extensive process of drug development by introducing rational drug design as a method for drug development instead of the traditional cell-based screening.

Rational drug design

According to a medical dictionary, rational drug design is '*the study of the shape of molecules in order to determine how they will bind receptors on cells or combine with other molecules'*.[3] Most of the existing drugs operate by interacting with their target (Reddy & Parrill, 1999). These targets can be human proteins (like enzymes, receptors or membrane transporters) or pathogenic organism targets (for example from bacterial, viral or fungal pathogens) (Landry & Gies, 2008). When a drug interacts with its target, the drug inhibits the target to fulfill its biological function. The better the interaction between drug and target is, the more the target is inhibited.

---

1 http://spdbv.vital-°©- it.ch

2 http://www.yasara.org

3 http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/rational+drug+design

So, for rational drug design, both the target and the target's structure must be known in order to study how a lead (potential drug) will bind to this target and how this interaction might be improved.

This is where MM becomes useful: computer tools and docking programs are used to visualize, calculate and predict interactions between leads and targets (Lybrand, 1995). More specific predictions about the behavior of leads can be made based on this in silico experiments. But nowadays, when a specific lead is believed to have potential, this lead can be optimized in order to increase the interaction with its target and thereby improve the lead. This process is called *lead optimization* (Jorgensen, 2008). All these opportunities of MM can reduce the number of potential drugs to be examined in vitro or in vivo experiments. Therefore, both time and costs can be saved by using MM, since only the most promising leads are being considered for further research (Lybrand, 1995; Reddy & Parrill, 1999).

There are different ways to do lead optimization, but *bioisosterism* plays a significant role in this process of drug development. Bioisosterism is a strategy that is used to develop drugs with a focused approach (Lima and Barreiro, 2005). This strategy involves the displacement and/or replacement of (groups of) atoms of the lead in such a way that the lead can better bind to its target and thereby inhibits the target's function. It is a precondition that structure of both the lead and the target, the interactions and mechanisms that induce the binding, the enzyme activity and inhibition are known. Bioisosterism involves a careful analysis of different aspects of the lead, such as size, electronic distribution, hydrogen bonds, etc., to predict which (groups of) atoms can be replaced.

This lead optimization as strategy for drug development can be transformed to education tasks as well. It is important to note that this lead optimization involves the integration of both 3D visualization and molecular interactions: based on the promising results of previous studies about MM in Chemistry Education, we believe that 3D visualization of the binding between lead and its target can help students to predict what molecular interactions are present and how the lead can be changed in order to increase these interactions.

Molecular Modeling in Education

Studies show that the application of authentic inquiry (like the development of drugs, using MM as a tool) in classroom promotes inquiry among students, since the activities of authentic inquiry are placed within contexts that consist of high degrees of complexity (Lee & Butler, 2003). The use of this authentic inquiry as pedagogical strategy in science education was already advocated many years ago: Schwab (1962, p. 66) claims that this authentic inquiry '*not only [offers] the clarification of inculcation of a body of knowledge but the encouragement and guidance of a process of discovery on the part of student'.*

Unfortunately, since the content knowledge and scientific thinking of students are not sufficient, these real-world sciences are frequently not available for students (Edelson, 1998). Therefore, this complex authentic research must be transformed into appropriate activities in order to design teaching materials that are accessible for

students. Even though lead optimization in real world is much more complicated and researchers have to take into account many other different aspects, such as chemical reactivity, solubility and pKa values (Lima and Barreiro, 2005), many of the interactions between these molecules can be translated to a level that is appropriate for high school students. For example, high school students should know what hydrogen bonds, van der Waals forces, ionic bonds and dipole-dipole bonds are, how these interactions can be formed and how hydrophobic and hydrophilic aspects play a role in interactions between molecules (College van Examens, 2014). These are interactions that drug developers also take into account when developing a new drug.

We are now faced with the important challenge to integrate the development of drugs, using MM as a tool, as an authentic inquiry for scientists in science education. Authentic research can be transformed and integrated in science education in four different ways. According to Lee and Butler (2003, p. 927), this authenticity can be integrated:

1. *Using real-world problems faced by scientists;*
2. *Through students' solutions of problems from their own lives;*
3. *By linking students and scientists through data sharing, critiquing and direct communication;*
4. *When science tasks address what scientists do to reach common understandings including argumentation, presentation and communication.*

In line with the application of authentic inquiry and the addition of MM in science education, drug development is a suitable context to integrate both 3D visualization and molecular interactions. This context meets two of the above-mentioned ways to integrate authentic inquiry in science education: drug development is a real-world problem (1), for example because of the resistance against existing drugs among (parasitic) diseases (Bloland, 2001; Renslo & McKerrow, 2006) and students' tasks contain the same approach as what scientists do in real-world do develop new drugs (Flannery, Chatterjee and Winzeler, 2013) (4).

Scope and Research Question

This study is placed within the broader context of developing and investigating context-based curriculum units in science education (and more specific in Chemistry education). The aim of this study is to add knowledge about how students both affectively and conceptually can be supported to use MM themselves and to get more insight into the integration of 3D visualization and the interaction between molecules, using MM. When this knowledge is uncovered, more teaching materials can be developed to respond to the lack of teaching materials regarding MM. Therefore, this study focuses on the following 3 research questions:

1. *'How can students affectively be supported to use MM as a tool in the context of drug development?*
2. *'To what extent does the sequence of learning activities in the context of drug development makes sense from a student's perspective?'*

3. *'To what extent do students integrate the 3D visualization and molecular interactions when using MM as tool for drug development?'*

These research questions are related to each other and more or less follow one another. When students are not motivated to use MM, they probably experience more difficulty in performing the learning activities. That subsequently might result in no integration of the 3D visualization and molecular interactions. Therefore, we believe that research question 1 and 2 can support research question 3.

Method

In this section, both the designed curriculum unit '*Molecular Modeling, Drug Development against Malaria Disease'* and the research setting, data collection and data analysis are explained.

Pilot study

For this study, a Dutch curriculum unit called '*Molecular Modeling, Drug Development against Malaria Disease' is* used (see appendix A). The curriculum unit was developed (Sanders, 2012), elaborated and improved (Enckevort, 2014) by the University of Utrecht. Enckevort's pilot study showed promising results for the future; students showed a rather independent and explorative learning behavior when working with the curriculum unit. Moreover, they experienced great affection for both the context and the structure of the curriculum unit. Analysis of the questionnaires completed by students indicated that students' insight in MM increased after completing the curriculum unit. However, since students in the pilot study voluntarily signed up, showed higher results at school compared to the average Chemistry student in the Netherlands, and received a small financial compensation for their contribution, little can be said about results of the curriculum unit in real class situations. Therefore, the present study is placed within a real class situation.

Also, based on the results of the pilot study, some suggestions for improvement were mentioned. Therefore, the first phase of this study is used to thoroughly revise and improve the curriculum unit, based on Enckevort's recommendations in response to the pilot study and both the teacher and researcher's experiences during the pilot study. Arguments for and adjustments of the curriculum unit's design will first be described below.

Design-Based research

Parallels can be found between this design-based research and the study of Prins, Bulte and Pilot (2010). The curriculum unit is an instructional design that consists of teaching and learning activities, which are supported by a so-called *scenario* (Lijnse, 1995). The scenario contains a worked-out example of the different activities, including the learning goals. '*This [scenario] describes the relation between all the teaching and learning activities and expected processes that result from them'* (Lijnse, 1995, p. 8). These expected processes are established from both literature, an

expert in drug development and experiences & findings from the pilot study. Analysis of this curriculum unit in class will show whether these expectations are true.

Since the pilot study showed students' high interest in the context drug development against malaria disease, we used this context for the adjusted curriculum unit as well. However, we did change the drug development approach within the curriculum unit in line with authentic inquiry of drug development. Lead optimization as method for drug development against malaria disease is used as what we call the 'expert approach' in the curriculum unit: students perform the drug development process similar to how an expert in drug development would do. The transformation of this expert approach to the designed curriculum unit also required some additional didactical aspects in order to make the whole process understandable for students. These will be further elaborated in the data collection section.

The scientific expertise of an expert in drug development is used to examine the curriculum unit for this expert approach. This expert is Associate Professor Computational Medicinal Chemistry at Utrecht University and he validated that the approach of the curriculum unit is similar to drug development in real life – although simplified in order to meet students' capability. He confirmed that the sequence of learning activities was similar to what an expert would do and he agreed with the additional didactical aspects.

The suggestions that derived from the results of the pilot study were mainly about the content of the curriculum unit: some activities were unclearly formulated and other aspects required a more thorough explanation or practice. Some background information and several concepts in the curriculum unit were explained wrongly. Also, the teacher for example added that students experienced difficulties in formulating the problem about the interaction between substrate and enzyme. These are some examples that we have taken into account when adjusting and improving the curriculum unit to make sure that all aspects were understandable.

Finally, to stimulate students' integration of 3D visualization and molecular interaction, more activities within the curriculum unit were explicitly focused on this integration. Students are requested to relate structure to interactions and we believe that this stimulation would increase students reasoning about molecular interactions.

Curriculum unit

In this context-based curriculum unit, students ranging from 16-18 years of age take the role as a researcher to develop a new potential drug against malaria disease, which is useful for the emerging resistance against existing drugs. This real life context is expected to motivate the students to use MM. In this curriculum unit, *lead optimization* is used as modeling approach, since this is the authentic inquiry approach used in real drug development as well. After an introduction about the malaria context and drug development approaches, students are guided to the main assignment: lead optimization of pyrimethamine. Pyrimethamine is an existing drug against malaria disease that inhibits the parasitic protein DHFR. However, some of the malaria parasites became resistant against pyrimethamine due to mutations in their DNA (Wongsrichanalai, Pickard, Wernsdorfer, & Meshnick, 2002). In order to

develop a new drug against malaria disease for the resistant parasites, students are challenged to develop an analog of pyrimethamine, which has better binding affinity to DHFR mutants than pyrimethamine itself.

To get more insight into concepts related to drug development and the binding site for the DHFR protein, students use the MM software tool ArgusLab. This software tool was chosen because of its easy use, free availability and variable capabilities (Oda & Takahashi, 2009). ArgusLab enables students to develop a new drug for malaria disease, using visualization and calculations of binding energy between molecules. This tool helps them to perform lead optimization by changing functional groups of pyrimethamine in order to increase its binding affinity to DHFR (mutants). The curriculum unit finishes with the evaluation of the learning process and lead optimization as an approach for drug development against malaria disease. This all is done through six different chapters, each reviewing a new aspect in the process of lead optimization. The seventh and final chapter of the curriculum unit consists of (optional) additional assignments, which the students in this study did not perform and therefore chapter seven is not included in this study. In table 1 an overview of the curriculum unit's content and learning goals is given (as explained, chapter seven is not included).

Research setting

After the curriculum unit was designed and validated by the expert in drug development, it was implemented at one 5 VWO class at the Arte College, a Dutch high school in Almere. Students attending both Chemistry and Biology class have conducted the curriculum unit in May and June 2016 as their final assignment of the year. The class consists of 18 students (12 girls and 6 boys), ranging from 16-18 years old. One girl did not participate, since she had conducted the previous version of the curriculum unit already. The Chemistry teacher was also involved in the development of the curriculum unit and has used the previous version of the curriculum unit before. Prior to the start of the experimental phase, the teachers were informed about and prepared for appropriate using of the new parts of the adjusted curriculum unit.

For a period of 5 weeks, students have participated in the curriculum unit during their 2 weekly Chemistry classes and 2 weekly Biology classes (60 minutes per class, see appendix B for planning). Students were divided into 8 groups of 2 students (1 group of 3 students), based on their previous Chemistry results. This resulted in 4 groups of low level (L), 2 groups of medium level (M) and 2 groups of high level (H). Prior to the start of the curriculum unit, 3 groups (one group per level) were randomly selected for the interviews and presentations. So in total 6 students were interviewed, since each group consisted of 2 students.

Data collection and analysis

In order to give answers to the research questions, we have to take into account three different components of the curriculum unit. Each component is analyzed separately in order to give an answer to one of the corresponding research questions (so component 1 is used for RQ 1, etc). The components are part of the curriculum unit to

Table 1. Overview of both the content and the learning goals of the curriculum unit.

Chapter	Brief description of the content and learning goals.
I: Malaria: a severe disease.	Students are introduced to the context of Malaria disease: Characteristics of the disease, how it can be prevented, what kind of drugs already exist and why it is necessary to develop new drugs against Malaria disease are all discussed in this first phase. The latter one is because of the resistance against existing drugs.
II: The development of new drugs.	Chapter 2 contains three different approaches of drug development that are being used in real life. These are all reviewed and students learn that *lead optimization* is an appropriate approach for drug development against Malaria disease because both lead (pyrimethamine) and target (DHFR) are already known.
III: Examination of lead target DHFR.	The structure of proteins in general and more specific the structure of the target protein DHFR is explored. Both competitive and non-competitive inhibition are discussed. Students use the structure of DHFR and zoom in on its binding site to predict what kind of interactions are possible with a potential lead. For this they use both drawings and the computer program Arguslab, for which students are instructed how to use it.
IV: Examination of lead Pyrimethamine.	Next, students learn about different kind of interactions and how these can be related to the binding energy. Pyrimethamine is build in Arguslab and first dockings between DHFR and pyrimethamine are implemented. The interactions between enzyme and substrate (or enzyme and inhibitor) are being further studied and students learn that the lower the value of the dissociation constant (Ki) is, the stronger the interaction between enzyme and inhibitor is.
V: Test and develop Pyrimethamine-analogs as inhibitor of DHFR.	Different mutants of DHFR and different example analogs of Pyrimethamine are examined and used for docking in Arguslab. Based on the results of these dockings, students are challenged to develop their own analog of pyrimethamine that is also able to inhibit the mutants of DHFR. Bioisosterism is used as strategy to adequately change pyrimethamine, based on size, electronegativity, possible interactions, hydrophobicity, etc.
VI: Towards a new drug.	Students reflect and evaluate the process of lead optimization as approach for drug development against Malaria disease. They should be able to explain how MM contributes to the development of drugs.

fulfill a specific function. These three components, including their function, are listed in the table below:

Table 2. Components of the curriculum unit with their specific function.

Component	Function
1. Context drug development against malaria disease	Motivation
2. Expert approach	Sequence of learning activities makes sense from a student's perspective: 'just in time' delivery of information.
3. Integration of 3D visualization and molecular interactions	Gives students true image of MM: Reasoning about why pyrimethamine has been changed, based on 3D visualization / interactions.

Table 3 shows how different data sources are used to analyze these three components. In all cases, first interviews and questionnaires are used for analysis. This is decided because students were able to discuss or consult other sources for their written answers and presentations. Interviews and questionnaires reveal the most intuitive answers from the students and therefore are the most reliable. Only in case these data did not provide (enough) information, data from written answers and presentations are used to complement the data. Below, for each component the specific function and analysis procedure are explained.

Component 1: Context drug development against malaria disease in service of MM.
The context drug development against malaria disease is chosen because of its motivational contribution that was shown in the pilot study. Questionnaires and interviews are used to explore whether this context and the approach of the curriculum unit have the same motivational effects in real class situations. The quantitative data of the questionnaires can be complemented by the interviews, since the latter one are used to get more insight in students' reasoning about their motivation (the questionnaires only reveal *whether* students are motivated or not, not *why* in particular). To reveal students' reasoning, we were looking for students' comments that referred to motivation about either drug development against malaria disease, the design and approach of the curriculum unit or MM itself.

Component 2: Expert approach.
The curriculum unit is designed in accordance with authentic inquiry, using lead optimization as strategy for drug development. This resulted in the expert approach: students perform the drug development process similar to how an expert in drug development would do. In case the sequence of information and different activities

Table 3. Overview of the different data sources used for the three components.

Data sources	Questionnaire 1	Interview 1	Interview inbetween	Interview 2	Interview 3	Questionnaire 2	Presentations	Written answers
Component								
A. *Context 'drug development against malaria disease'* Function: Motivation	×	×		×	×	×		
B. *Expert approach* Function: Sequence of learning activities makes sense from a student's perspective: 'just in time' delivery of information.		×	×	×	×			×
C. *Integration of 3D visualization and molecular interactions* Function: Gives students true image of MM: Reasoning about why pyrimethamine has been changed, based on 3D visualization / interactions.					×	×	×	×

within the curriculum unit is well built, students are believed to understand *why* they have to do a particular activity and that the sequence of this expert approach would make sense from the students' perspective. In order to examine the expert approach, a framework was developed in which 9 sections of the curriculum unit were placed (see table 4). These sections were selected as most important aspects of the curriculum unit and all sections follow one another. It is important to notice that section 2 and 7 ('DHFR structure' and 'Binding energy in relation to Ki') are examples of those didactical aspects that were added to the expert approach in order to make the process more understandable for students. For example, activity 11 was added to the curriculum unit to focus specifically on what the binding energy in relation to Ki is (see appendix A). Drug developers in real life do not perform such an activity, but it does help students to understand what this Ki really means. The same applies for additional activities regarding the DHFR structure.

Table 4. Nine most important sections of the curriculum unit.

Section
1. Lead optimization as approach for drug development
2. DHFR structure
3. Active / binding site
4. Interactions lead & target
5. Docking with Arguslab
6. Interpretation binding energy
7. Binding energy in relation to Ki
8. Docking of mutants and example analogs
9. Bioisosterism to develop a new analog

Interviews and written answers are used to look for reasoning or comments from students that can explain why these sections should be performed according to them, or why something must be known before they can proceed with the next step. When students are correctly able to explain why a particular section should be carried out, this means that the purpose of this section makes sense from a student's perspective and that this section is put at the right place and time within the sequence of activities: this realizes the 'just in time delivery of information'.

Students' reasoning or quotes are subsequently coded as 'yes', 'partial' or 'no'. In case a group was able to correctly explain a particular section's function, this section would be indicated as an achieved section. If the reasoning was incomplete, but did show some correct aspects, the section was indicated as 'partially achieved'

and if no (correct) reasoning was found, it was indicated as ‘not achieved’. All nine sections were analyzed for the three selected groups (L, M and H). A second researcher independently coded all students’ reasoning or quotes that the first researcher had found. This resulted in agreement about more than 80% of the encoded fragments, and for the other 20% the least positive outcome was chosen. So in case a section was coded as both ‘yes’ and ‘partial’ for one of the groups, this was coded as ‘partial’.

Subsequently, results from the different groups were combined. When at least two out of three groups showed a ‘yes’ for a section, the purpose of this section is believed to be well understood and thereby achieved. If at least two groups are indicated as a ‘no’, this section is believed to function insufficiently. All combinations inbetween are indicated as ‘partially’ achieved.

Component 3: Integration of 3D visualization and molecular interactions.
This integration mainly takes place at the end of the curriculum unit, when students are developing their own analog. Therefore, only the data that are collected after completion of the curriculum unit are used for analysis of this component. This involves the analysis of the final interview and second questionnaire and in case this does not provide (enough) information, written answers and presentations are used in addition. Students are being asked to explain how they have developed their own analog and what they have learned from the curriculum unit. To determine whether this integration of 3D visualization and molecular interactions has occurred, we were looking for reasoning or comments from students that reveal whether students change pyrimethamine based on structure (3D visualization) and interactions or based on something else.

Interviews. Prior to the start of the curriculum unit, 3 groups (one group per level) were randomly selected for the interviews. Interviews were conducted at the beginning (interview 1) in the middle (interview 2) and after finishing the curriculum unit (interview 3). All interviews were semi-structured to reveal students’ reasoning about the different components of the curriculum unit. The interviews lasted about 10 minutes and students from the same group were interviewed together. The interviews were audio recorded and transcribed. See appendix C for interview protocols.

Interview inbetween. This interview is different from the other three interviews, since this is a very short interview inbetween, which is only focused on the sequence of learning activities. The groups were asked to tell what they are doing and what they think they would be doing next and why. This is hoped to reveal whether the sequence of learning activities makes sense to the students.

Questionnaires. The whole class has filled in the questionnaires after activity 3 (questionnaire 1) and after finishing the curriculum unit (questionnaire 2) (see appendix D for questionnaires). 3 students were absent during questionnaire 2, so they did not fill in the final questionnaire.

Presentations. After finishing the curriculum unit, each group had to give a presentation about their own developed drug, using a scientific poster. This presentation is not part of the curriculum unit itself, but was part of a final assignment of the school. These presentations were used in addition to the interviews, to reveal possible reasoning about students' development of the drug that was not yet mentioned during the interviews. The presentations were audio recorded but not transcribed, since they were only used in case the interviews did not provide enough information.

Written answers. Written answers of all students were collected. In order to analyze the written answers, a scenario (made by the author) is used to compare the written answers of the students to a worked out example (see appendix E). This scenario is made based on what students should know or master according to their level of high school.

Observations. During the implementation of the curriculum unit in class, observations were made by author of this paper. The aim of these observations is to see whether the educational process is carried out with sufficient quality.

In figure 1 a timeline is shown, which indicates at which time point the different data are collected. The numbers in the timeline represent the different activities of the curriculum unit that students had to perform.

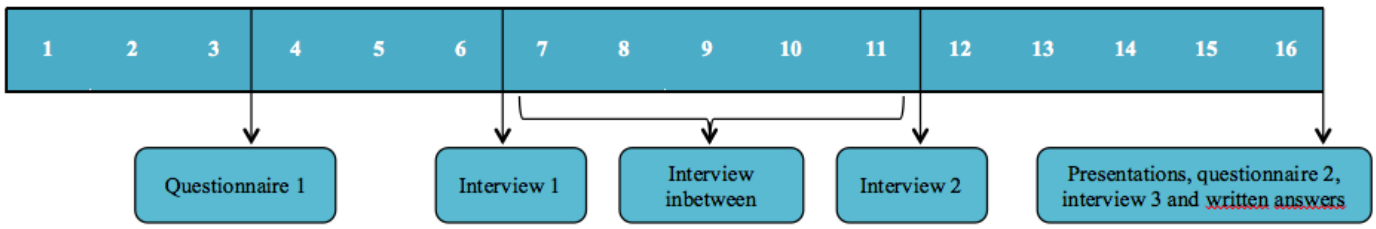


Figure 1. Timeline of data collection.

Results

The observations during the implementation of the curriculum unit in class indicated that the educational process was carried out with sufficient quality. Teachers were very satisfied with both the content of the curriculum unit and the educational process in class. Feedback from the teachers about the approach of the curriculum unit and the learning outcomes were very positive. Therefore, we believe that this setting was appropriate to be used for this research.

In this section the results for each component are presented. After each component, a short summary is given to highlight the general impression of the results. The results of all components will be combined in the conclusion and discussion.

Component 1: Context drug development against malaria disease in service of MM
Questionnaire 1 shows that the average appreciation of Chemistry at the beginning of the curriculum unit is rather high, namely a 7,4 (SD 0.7) on a scale of 1-10. On a 5 points Likert scale (1 corresponds to strongly disagree and 5 to strongly agree), students indicate their rather average to positive attitude towards the context drug development against malaria disease, see table 5 below.

Table 5. Results of questionnaire 1

Statements about drug development	Average score (SD)
I think that drug development is an interesting subject.	3.8 (0.7)
I would like to learn more about how drug development goes.	3.6 (0.8)
The relevance of drug development appeals to me.	3.6 (0.8)

The first interview confirms and illustrates this positive attitude towards the context drug development against malaria disease:

S6 (L)[4]: It's not something you would just do. It's not something, if you would just have a teaching book, that would occur.

S13 (H): I liked doing research to a drug, especially during the first few activities. Looking up for the leaflet on the Internet and then also what the pros and cons are. I found that interesting.
Teacher: Why did you find that interesting?
S13 (H): Just because, at least, that's what I thought was cool, is that you see how drugs really are, and that besides that they have a purpose, they can still do other things. Such as the side effects and how they differ and that there is also a real chemical side to it.
S12 (H): And I think it's a nice curriculum. Because it's about a subject that is quite topical. I once went to such a malaria area, and then suddenly, you do have to take some pills. And that's really scary, actually. So damn, this disease does still exist. I think it's mainly just interesting and fun.
S15 (M): I think it's really interesting. I'm also wondering about what we eventually will do at the end. [...] I also like the fact that we really are going to do research.

During this first phase of the curriculum unit, students do not mention anything about their interest in MM. This corresponds our expectations, since students are only introduced to the context Malaria Disease and drug development at this point and they

[4] S6 (L) indicates that this is student 6 who is from group low.

have not learned or done anything with MM yet. But these results do reveal students' overall interest and motivation towards the context itself. In accordance with the general view of interest in the motivation literature, interest is identified as a subset of motivation (Ainly, 2012). Therefore we believe that students' interest also leads to a growing motivation.

During the second interview, again students mentioned that the context was interesting. Two of the three groups only mentioned the context drug development against malaria disease as aspect of their interests:

S14 (M): Well, the start about those drugs and about the different ways of drug development. I thought that was interesting.

S7 (L): Yes, it's not something you would just do. A drug against malaria and then also lead optimization. And yeah, that is quite interesting to do. It's something different than learning from a book.

The third group also showed that their interests are related to aspects of MM:

S13 (H): It becomes better as you start understanding things. So when we just started with Arguslab, then everything is so weird actually. But now we can subtract useful information out of it, so we can change pyrimethamine in analog 1 or analog 2, if we want. So then it becomes more fun.

S12 (H): It all got more meaning. So 'oh, here is a mutant, so we can adapt pyrimethamine on it'. So that indeed is fun.

Students' overall impression of the curriculum unit is positive and they all explained that they liked working with the curriculum unit. However, still all students mention that they sometimes experience difficulty in knowing what to expect from them exactly. For example, S14 finds it hard to see the coherency of the curriculum unit:

S14 (M): Sometimes I don't quite know what we are doing. Because, look, I am doing what is in the assignment, and then I get that. It's just, I find it hard to see it in the bigger picture.

All three groups told about both positive and negative experiences with the program Arguslab. First, they showed a little frustration about the program's crashing or the fact that the program does not always operate as they want it to. On the other hand, the students also showed that they liked to work with Arguslab: 'It's fun to build pyrimethamine in Arguslab' (S12) and 'I think it's nice that we get to know Arguslab' (S14).

Analysis of questionnaire 2 shows that the average appreciation of the curriculum unit is 6,4 (SD 0.9) on a scale of 1-10, which is one point lower than the average appreciation of Chemistry (7,4) at the beginning of the curriculum unit. On a

5 points Likert scale (1 corresponds to strongly disagree and 5 to strongly agree), students indicate a rather neutral attitude towards the curriculum unit when they compare it to their regular Chemistry lessons, see table 6 below.

Table 6. Results of questionnaire 2.

Compared to regular Chemistry lessons,	Average score (SD)
The approach and the method of this curriculum unit are pleasant.	3.3 (0.9)
This curriculum unit is more fun and motivating.	3.0 (1.0)

Even though students were rather positive about the context drug development against malaria disease at the beginning and in the middle of the curriculum unit, according to the second questionnaire students' final appreciation of the curriculum unit was a point lower than their appreciation of Chemistry itself (6.4 compared to 7.4).

Students also became less positive about the curriculum unit: the 'fun and motivating' aspect of the curriculum unit was scored lower at the end (3.0) compared to the scores they gave at the beginning (3.8 for 'drug development as an interesting subject' and 3.6 for 'like to learn more about how drug development goes'). This decrease in motivation can be supported by the final interviews, which reveal suggestions for this decrease in student's motivation. During the final interview, students were asked to give both positive and negative aspects of the curriculum unit. One group (M) touched upon their positive interest regarding the context drug development:

S14 (M): Well, positive is all the information that we received, we really have learned a lot. And I thought that the information we got, was really interesting. About drug development.

The other 2 groups did not explicitly mention anything about that or their interest regarding working with MM. They rather referred to other practical issues: Group (H) and (L) complained that it was not clear what was required from them during their presentation. Group (H) and (M) mentioned an increase in their workload because they did not get enough time to work on their assignments. This was also mentioned by group (L) before, during the second interview. Group (M) and (L) mentioned that some of the activities were unclearly formulated (group (H) on the other hand, explained that everything was formulated very clearly). Notable, is that all groups finally did mention that the individual activities or the whole curriculum unit, turned out well.

S7 (L): Right, what eventually turned out well, I think, is the activity. Some looked really difficult at first, but eventually, when you just read well and looked up a few things, then it was doable.

S12 (H): Right. Positive things are that the curriculum unit works well, it is just very clear, with those pieces of information, and then again with some questions about it.

Group medium supports this, but still thinks that it was hard to see the bigger picture of the assignment during the curriculum unit. Even though they claim that they discovered it at the end, they still do not seem to know what MM is exactly:

Teacher: Do you still think that, or only during the curriculum unit? Or do you still think it is hard to see the bigger picture?
S14 (M): No, at the end it came back, so that is nice. Only during the process it was a little bit difficult. [...]
S15 (M): Right, I actually agree a little bit. I do get all the separate pieces, but then at the end we got the question: 'what does MM contribute to drug development?' and then I thought: right, what is that exactly actually?

Summary component 1

At the beginning of the curriculum, students showed an overall positive attitude towards the curriculum, of which they explained was mainly because of the context drug development against malaria disease. The low group also mentioned that it was because of the curriculum unit's different approach compared to their regular 'working from a book' approach. This positive attitude is carried on through the curriculum unit, since students kept making mention of the 'interesting context' and that they 'liked working with the curriculum unit', but later on also the 'fun part of Arguslab' was added. Meanwhile, also frustrations concerning Arguslab and its functioning started to increase among all students. During the final interview, students talked less about their interests regarding the context or working with MM, but rather referred to some practical issues that bothered them or turned out well for them. The questionnaire also showed a decrease in motivation at the end compared to the beginning of the curriculum unit, but students still scored above average for their motivation.

Component 2: Expert approach

Table 7 shows the results of all sections of the expert approach per group. Illustrations are provided to see how the reasoning of students was interpreted. These results of the three groups are subsequently combined to see whether the sections were achieved or not, which is indicated in table 8.

Table 7. Overview of the results (yes, partial, no) per group (low, medium, high) of each section of the curriculum unit with illustrations.

Section	Group			Illustrations		Data source
	Low	Medium	High			
1. Lead optimization as approach for drug development	Partial	Yes	Yes	S6 (L):	You have something [pyrimethamine] of which you know it already works. So you probably can find something [new lead] that works again faster than that you have to do the whole process again.	Interview 1
				S14 (M):	I think, isn't that because the lead is known and the target protein is known.	Interview 1
				(H):	The lead and target protein are known. You don't have to do, for example, the whole cell screening any more. So you can go on with the lead optimization right away.	Activity 6
2. DHFR structure	No	No	No	-		-
3. Active- and binding site	Yes	Yes	Partial	Teacher: S7 (L):	So what are things you will pay attention to when you are working with MM? The molecules that are in the binding site. For example, NH, than hydrogen bonds can be formed with pyrimethamine.	Interview 2
				Teacher: S14 (M): Teacher: S14 (M):	So what are the things you will pay attention to when you are working with MM? [...] And also [characteristics] of the target protein. And what would you like to know about the target protein? The structure of the active site perhaps? How it binds. Yes, that.	Interview 2
				Teacher: S12 (H):	And what kind of results [docking with Arguslab] would that be, do you think? That it won't bind to the active site of the protein or that it would bind to things it should not bind to.	Interview 1

Table 7. *(Continued)*

Section	Group: Low	Group: Medium	Group: High	Illustrations		Data source
4. Interactions lead & target	Partial	Partial	Partial	Teacher: S6 (L): Teacher: S6 (L):	So what are the things you will pay attention to when you are working with MM? The bonds that are being formed. The interactions between the molecules. So what kind of interactions are possible? Hydrogen bonds, van der Waals forces, disulfide bridge. Different interactions.	Interview 2
				Teacher: S15 (M): Teacher: S14 (M): Teacher: S14 (M):	How can a lead make sure that it inhibits the enzyme better? Perhaps that it binds better? And how could you make sure that a lead would bind better to the enzyme? Changing of the molecule formula? Right, the structure? Amino acids, those things. Could you give a concrete example of what would be changed to the lead molecule? Well, the part that binds to the active site.	Interview 2
				S12 (H):	You are going to look [with Arguslab] what kind of bonds it [pyrimethamine] can form in the protein. Because then you can see: Oh, there should be a hydrogen bond formed over here, or there is one too many.	Interview 1
5. Docking with Arguslab	No	No	Yes	(L):	They mention that they are looking at the interactions between lead and target, but not why they do that.	Interview inbetween
				(M):	They mention that they are going to ‘test’ things, but not why or how.	Interview inbetween
				Teacher: S12 (H):	Can you think of what you could do with this knowledge, now you have docked the molecule pyrimethamine to DHFR? [...] Then we know which bonds are important where in the binding site. So if we are able to make something else with the same bonds at those places, then that might have a	Interview inbetween

Table 7. *(Continued)*

Section	Group: Low	Group: Medium	Group: High	Illustrations		Data source
5. Docking with Arguslab				S12 (H):	similar action as pyrimethamine, namely that the protein does not work anymore. And that is what we want.	Interview inbetween
6. Interpretation binding energy	Yes	Yes	Yes	S6 (L):	The more negative the binding energy is, the better it [inhibitor] binds.	Interview 3
				Teacher:	Ok, and a low binding energy, what does that mean? That it [inhibitor] binds good or bad?	Interview 3
				S15 (M):	That it binds good.	
				S12 (H):	The lower the binding energy is, the easier the inhibitor binds the protein.	Interview 3
7. Binding energy in relation to Ki	No	No	No	-		-
8. Docking of mutants and example analogs	Partial	No	Yes	S7 (L):	Well, we have looked at the results of activity 13 [testing of pyrimethamine analogs]. They showed that analog 1 was the strongest, the best one, that one had the lowest binding energy. Only not with the DHFR wildtype, pyrimethamine was the lowest binding energy there. And then, I just did a little bit of 'trial and error'. I kind of combined those two, so I had 3 different analogs and eventually I took the best one.	Interview 3
				Teacher:	What are we doing with this curriculum unit?	Interview 2
				S14 (M):	Right, we are looking whether, how pyrimethamine works on the different mutants, I think, because we have to dock those mutants of DHFR in Arguslab. I think you look at that, how it… No, I think it is hard to explain.	

Table 7. *(Continued)*

Section	Group: Low	Group: Medium	Group: High	Illustrations		Data Source
8. Docking of mutants and example analogs				S13 (H):	But also that you can change a drug for when there are mutations [in the target protein]. So the double mutant and quadruple mutant, that you, right.. Because the same drug does not work that well for the mutant, that is why they are a problem. And if you have to change the molecule a little bit, because that is what we have seen with analog 1, and then on the double mutant, that one works way better than the standard pyrimethamine. But there only were 2 adjustments. [...]	Interview 2
				S13 (H):	We can change pyrimethamine in analog 1 or analog 2, if we want [...].	
				S14 (H):	It all got more meaning. So 'oh, here is a mutant, so we can adapt pyrimethamine on it.	
9. Bioisosterism to develop a new analog	No	Yes	Yes	S7 (L):	Well, we have looked at the results of activity 13 [testing of pyrimethamine analogs]. They showed that analog 1 was the strongest, the best one, that one had the lowest binding energy. Only not with the DHFR wildtype, pyrimethamine was the lowest binding energy there. And then, I just did a little bit of 'trial and error'. I kind of combined those two, so I had 3 different analogs and eventually I took the best one. [...]	Interview 3
				Teacher:	But with 'trial and error' you mean that you just added some groups here and there…?	
				S7 (L):	Right, but there was some sense behind it, it is both from analog 1 and pyrimethamine.	
				Teacher:	And what is the sense behind it then?	
				S7 (L):	Well, because analog 1 was the best from the results of activity 13, except for DHFR double mutant. No for the wildtype, there it was less well and pyrimethamine itself was better. So I thought, right, just find a balance between both.	

Table 7. *(Continued)*

Section	Group: Low	Group: Medium	Group: High	Illustrations		Data source
9. Bioisosterism to develop a new analog				S14 (M):	Yes, that [bioisosterism] is the strategy to change certain groups of the lead and then you look.. Yes, or you change them that it works better on the lead. No, on the enzyme.	Interview 3
					[...]	
				Teacher:	Right, could you explain, how did you get this analog?	
				S14 (M):	Well, by keep trying it, to keep changing that group with Arguslab. And then we figured out that halogens worked well and created a low binding energy, what we were looking for.	
				S13 (H):	So we thought: well, if a molecule becomes heavier, so increases in mass, then it has more van der Waals forces [...]. And if you make the molecule, what is it, very polar, then also energy is released. Then you get those dipole-dipole.. That is what it is called, right?	Interview 3
				S12 (H):	Right, dipole-dipole bond.	
				S13 (H):	Dipole-dipole bond. So we thought: right, halogens are ones we have to take a look at for dipole-dipole bonds and then we look in the periodic table for as far as possible down for the heaviest. So that is what we did in Arguslab and the heaviest halogen they had, was Astatine.	

Summary component 2

Table 8 indicates that 4 sections (lead optimization, active- and binding site, interpretation binding energy and bioisosterism) function to a sufficient extent, based on the threshold of a 'yes' for at least 2 of the 3 groups. This means that, in the case of those 4 sections, students are able to explain why they are implementing this particular aspect of the curriculum unit and that this information was delivered at the right time. However, 3 sections (DHFR structure, docking with Arguslab and binding energy in relation to Ki) need further attention, since they did not function well, based on the threshold of a 'no' for at least 2 of the 3 groups. The other 2 sections (interactions lead & target and docking of mutants & example analogs) still remain unclear, as they only function partially. The outcomes and interpretations of all sections will be further elaborated in the discussion section.

Table 8. Overview of achieved sections of the expert approach.

Section	Group			
	Low	Medium	High	Achieved
1. Lead optimization as approach for drug development	Partial	Yes	Yes	+
2. DHFR structure	No	No	No	-
3. Active- and binding site	Yes	Yes	Partial	+
4. Interactions lead & target	Partial	Partial	Partial	±
5. Docking with Arguslab	No	No	Yes	-
6. Interpretation binding energy	Yes	Yes	Yes	+
7. Binding energy in relation to Ki	No	No	No	-
8. Docking of mutants and example analogs	Partial	No	Yes	±
9. Bioisosterism to develop a new analog	No	Yes	Yes	+

Component 3: Integration of 3D visualization and molecular interactions

Questionnaire 2 reveals that students indicate that they now better know what MM is (4.0 on a 5 points Likert scale). However, when they are asked for an explanation during the interview about what they have learned, 29 per cent (4/14) wrote that they have learned 'what it is' without giving any further explanations. Only 21 per cent (3/14) wrote things like 'looking at and changing molecules'. The other 50 per cent of the students (7/14) wrote various other things, like 'it is a difficult process', 'it is

important', or 'it is used for resistance'. This is strengthened by the interviews, which reveal that students think they still do not know what MM exactly is. For example:

S15 (M): I do understand all the separate parts, but then at the and we got the question: 'What does Molecular Modeling contribute to drug development?' That I was thinking: right, what is it actually exactly?

However, as is shown in component 2, students do use MM to develop their own analog, so even though they can not fully explain what MM is, they do know how to use it.

During the final interview, students were asked to explain how they proceeded to develop their own analog. All groups explained that a better interaction between the pyrimethamine analog and DHFR resulted in a better potential drug, so that is what they all were looking for. Neither the interview, the presentation, nor the written answers of the students of group low showed a good illustration about the integration of 3D visualization and molecular interactions. Instead, during the interview they mentioned:

S14 (L): We knew that analog 1 had the lowest binding energy, so it had the most interaction with the double mutant. We took a look and we thought that it was because of the CF_3 group at Y, because it is a stable bond.

They did not integrate structure with interactions, but rather looked at the binding energy and tried to interpret the results based on the presence of a stable bond. However, students of group medium did tend to show this integration of 3D visualization and molecular interactions:

S14 (M): And SO_3H, right, that one I saw in the program Arguslab, so I thought: I'll try that one. And that also worked well. Because it formed hydrogen bonds.
[...]
Teacher: So why is this analog better than pyrimethamine?
S14 (M): Right, I think that is also because this [points to pyrimethamine] can form hydrogen bonds.

Also the presentation confirms what they said during the interview:

S14 (M)**:** That is because we noticed that SO_3H easily can form hydrogen bonds with the binding site of DHFR. And that is good, because hydrogen bonds are generally rather strong bonds.

Students of group high also showed an integration of structure and interactions:

S13 (H): So we thought: well, if a molecule becomes heavier, so increases in mass, then it has more van der Waals forces [...]. And if you make the molecule, what is it, very polar, then also energy is released. Then you get those dipole-dipole.. That is what it is called, right?
S12 (H): Right, dipole-dipole bond.
S13 (H): Dipole-dipole bond. So we thought: right, halogens are ones we have to take a look at for dipole-dipole bonds and then we look in the periodic table for as far as possible down for the heaviest. So that is what we did in Arguslab and the heaviest halogen they had, was Astatine.

In this example you can see that the students changed pyrimethamine based on 3D visualization and predicted interactions, but these are not particularly related to the structure of pyrimethamine and DHFR; this change can be applied to many other molecules, not only pyrimethamine in particular. Also their presentation confirmed what they said during the interview.

Summary component 3
Even though students generally declare that they have learned a lot, only a fraction of the students actually explained what MM is. Both interviews and written answers show that students *think* that they do not know what MM is, while they do actually *use* MM to develop their own analog. All students showed that stronger interactions between their pyrimethamine analog and DHFR resulted in an increased function of the potential drug. Students of group medium and high linked 3D visualization with molecular interactions, although not always correctly formulated.

Conclusion and Discussion
The aim of this study is to add knowledge about how students both affectively and conceptually can be supported to use MM themselves and to get more insight into the integration of 3D visualization and the interaction between molecules, using MM. In order to do this, first the three research questions will be discussed separately and afterwards a conclusion about the process in its entirety will be given.

1. *'How can students affectively be supported to use MM as a tool in the context of drug development?*

Results of component 1 showed that the context of drug development against malaria disease overall positively influenced students' motivation at the beginning of the curriculum unit. Especially 'malaria' and 'drug development' have been mentioned several times as interesting subjects, when students were asked what they thought about the curriculum unit. During the process, students also showed that they liked the different approach of the curriculum unit compared to regular Chemistry lessons and that they had fun working with Arguslab. The latter implicitly indicates student's

positive attitude towards doing MM, since students are doing MM with the program Arguslab. However, both questionnaire 2 and the final interview showed a decrease in this motivation at the end of the curriculum compared to the beginning. We believe that several aspects have negatively influenced students' motivation regarding the curriculum unit. First, students showed an increasing frustration about working with the program Arguslab at the end. Even though they were rather positive when they just started exploring the program, this changed once students started doing docking calculations with Arguslab. When students do not follow the steps of the instruction manual precisely or when they do not save their files regularly, the program can easily crash. This is a know limitation of the program (Enckevort, 2014) that unfortunately decreases students' motivation. Second, also frustration regarding the perceived high workload of the assignments was mentioned as aspect that students had encountered during the curriculum unit. Because of this, students did not have enough time to explore or test their own developed analogs thoroughly, which they mentioned as negative aspect of the curriculum unit. High workload is an aspect that has been shown negatively related to students' motivation (Kyndt, Docky, Struyven & Cascallar, 2011). So we believe that this experience also has negatively influenced students' motivation of the curriculum unit. However, this perceived high workload is not due to the curriculum unit itself, but due to the planning of the teacher or the procrastination among students: some students postponed their assignments, so they had to work hard to complete the curriculum unit within the given time. This procrastination is a common problem among students (Steel, 2007). However, all students eventually managed to finish the curriculum unit within time, but they did experience the final days as rather stressful, which, we believe, decreased their motivation. However, even though students' motivation has been decreased during the curriculum unit, they still score above average (3.0 at a 5 points scale) for their motivation.

2. *'To what extent does the sequence of learning activities in the context of drug development makes sense from a student's perspective?'*

Results of component 2 showed that some sections were achieved, but others did not function as expected. The implications of these results will be discussed below, within consideration of the component's original function: the sequence of learning activities makes sense from a student's perspective: 'just in time' delivery of information. The main focus will be on the sections that were *not* achieved, to discuss possible explanations and to put forward possible improvements for these sections.

Achieved sections

Students showed good reasoning about why they had to perform the four sections 'lead optimization as approach for drug development', 'active- and binding site', 'interpretation binding energy' and 'bioisosterism to develop a new analog'. This implicates that the sequence of these learning activities made sense for them. So more than half of the sections (4/7) that originally were part of the expert approach were

achieved, since the ‘DHFR structure’ and ‘Binding energy in relation to Ki’ are didactical aspects that were added to the expert approach in order to make the process more understandable for students.

Partially achieved sections

According to the results, both the ‘interactions lead & target’ and ‘docking of mutants and example analogs’ were partially achieved. Students did tend to know that they had to look at the interactions between lead and target or how these molecules bind to each other. However, most groups referred to random interactions instead of indicating the interactions that are actually present between lead and target. Also, they did not explicitly explain *why* they should be looking at the interactions. We believe that this is an essential section that needs further attention. For example, we recommend improving the worksheets that students used in the curriculum unit, in which the 2D binding site of DHFR was presented. During the curriculum unit, some students indicated that they experienced difficulty in understanding what the worksheet exactly showed them. This can be explained by the inconsistency of the worksheet: some of the amino acids were fully displayed, while others did not show the side chain of the amino acid. These side chains are rather important for the prediction of the interactions between lead and target. So therefore, we believe that improving these worksheets can improve students reasoning about the interactions between lead and target.

Students partially showed why they had to do the docking of mutants and example analogs. Eventually, all students did use the results of these dockings to develop their own analog. So we believe that, even though they did not fully explain *why* they needed to do this dockings, the fact that they used these results in further sections, slightly implicates that this sequence to some degree does make sense for the students.

Not achieved sections

Above all, the reason that the latter 3 sections (‘DHFR structure’, ‘docking with Arguslab’ and ‘binding energy in relation to Ki’) were not achieved, can be found in the data collection method. First, students are not explicitly asked to explain *why* they had to look at the structure of DHFR, *why* they needed to do the docking in Arguslab or *why* they needed to use Ki. So if no specific question evokes these kinds of explanations, it is therefore only reasonable that students do not mention them. But there are other reasons to put forward regarding these sections.

The structure of DHFR is related to the active- and binding site of DHFR. So when students were asked to elaborate about the things they would pay attention to when they are working with MM, it only makes sense that they mentioned the (structure of the) active- or binding site instead of the whole structure of DHFR. For drug development against malaria disease, you only need to know the structure of the active- or binding site, since that is where the inhibitor binds. And that is exactly what the students were perfectly able to explain. So the fact that the section ‘structure of DHFR’ did not function as expected, is explainable, since students already knew that

they had to look specifically at the active- or binding site. Also, the structure of DHFR was one of the additional didactical aspects to the expert approach and is therefore less important for the analysis of the expert approach.

However, we do argue that exploring the structure of DHFR should be part of the curriculum unit for two reasons. First, exploring the structure of DHFR activates students' prior knowledge about proteins. Prior knowledge generally has a positive effect on students' performance (Dochy, Segers & Buehl, 1999). So therefore, it is not convenient to go straight to the point of the active- or binding site before taking a look at the whole structure of the protein. Students do need to know where the active- or binding site comes from. Second, even if this addition of the structure of DHFR was a wrong judgment, we believe that exploring the structure of DHFR did not negatively influence the learning process, since all students were perfectly able to explain why they had to use the active- or binding site.

Unfortunately, students also were not able to explain why they had to do the docking with Arguslab and why they had to look at the binding energy in relation to Ki. It might be possible that they do know why this is, but since we did not explicitly ask them to explain, these sections need further investigation. A possible improvement for the understanding of the binding energy in relation to Ki can be found in an integrated enzyme kinetics experiment in the curriculum unit. Even though the effect of doing experiments in class on student's learning has not comprehensively been studied, many science educators do promote the advantage of using laboratory activities in class (Hofstein and Lunetta, 2003). Ideally, enzyme kinetics experiments with students' own developed analog are believed to give students more insight in this relation between the calculated binding energy and Ki. Since this is practically not really possible to do with students' own developed analog (because there are way too much possible analogs to develop), comparable enzyme kinetic experiments should be used. These results can be linked to the rather theoretical information about the Ki values, which the students have learned during the curriculum unit. We believe that this improves students' understanding about why the binding energy in relation to Ki should be considered.

Finally, the docking with Arguslab is an important aspect within the curriculum unit. Students were not able to explain why they had to do this, but this can be due to the fact that they were asked to explain this when they just started using the program Arguslab. They probably did not know what to do because they had to figure out what the program exactly does. As students indicated themselves: once they got to know the program, they knew what to do and they liked doing it. Moreover, all students finally did use the results of the docking. They can only use these results if they know what these results mean. So this implicates that they eventually did know why to do the docking, only they discovered it a little bit later in the process.

3. *'To what extent do students integrate the 3D visualization and molecular interactions when using MM as tool for drug development?'*

The third and last component was analyzed in order to see whether students' reasoning about their new developed analog was based on the integration between 3D visualization and molecular interactions or not. Two of the three groups did show this integration, yet not always correctly formulated. Even though these results show that this integration has occurred, we believe there is room for improvement. According to the expert in drug development, this could be improved by using another computer program instead of Arguslab. For this curriculum unit, Arguslab was chosen because of its easy use and free costs. But the expert also recommended Yasara[5] for example as appropriate program to use. Unfortunately the program is not free of costs, but it does enable the visualization of the modeling process using a so-called *surface*. This surface shows and indicates, for example, whether there is room for additional atoms or opportunities for hydrophilic of hydrophobic interactions. This facilitates the lead optimization process and probably helps the students to integrate 3D visualization and molecular interactions more than Arguslab does.

Another improvement might be found in the chosen target of drug development. The DHFR protein that was chosen and used in the curriculum unit is a well-studied and validated target to fight malaria (Da Cuhan et al, 2005; Anderson and Wright, 2005). However, all known mutants have mutations *outside* the binding site (for example, see Vanichtanankul et al, 2012). Only 6 mutants are known which have a mutation *inside* the binding site (for example, Chitnumsub et al, 2010. See the PDB[6] site for all known mutants), but these are all I164L mutations: an isoleucine is changed into a leucine, which has practically no influence on the possible interactions within the binding site. Isoleucine and leucine have a similar structure; the only difference is that the methyl groups are in different positions.

So the mutants that were used in the curriculum unit had mutations that did not (or hardly) change the binding site itself. The fact that these mutants did show a difference in binding energy and interaction with the lead can only be explained by changes *outside* the binding site. It has been shown that different mutations at residues outside the binding site are linked to resistance in malaria (Sirawaraporn et al, 1997). However, of course this complicates students' lead optimization process, since they are instructed to look at interactions within the given binding site of DHFR, not at residues beyond. It might be an improvement to use another target, one of which mutants do exist that have mutations in the binding site, which can explain the changed interactions with the lead more easily. In that case, we believe that students are able to integrate the 3D visualization of the binding site with the molecular interactions even more, since they can do lead optimization better, when they focus on the changes in binding site instead of changes outside the binding site which they can

[5] http://www.yasara.org
[6] http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

not see. Further research should be done to see whether it is possible to find a target with the appropriate mutants and to confirm whether this improvement is true or not.

When taking a look at the overall process, we believe that this curriculum unit has high potential for implementation in class. Even though there is room for improvement, results show that students were able to work through and learn from many aspects of the curriculum unit. This study investigated the integration of 3D visualization and molecular interactions using MM as a tool for drug development, which most students showed to implement when developing their own analog. We believe that the context of drug development and the expert approach within the curriculum unit have supported this integration, based on and what students show during their process of MM.

Limitations

This study contains some limitations that are important to put forward. First, the curriculum unit has been implemented in one class only. The 6 students that were interviewed in this small-scale study do not represent all Dutch Chemistry students. Even though this study showed promising results, more students should be taking part of the curriculum unit to strengthen these results. Second, the teachers that were involved in this study were familiar with the content and approach of the curriculum unit. So if other teachers would like to practice the curriculum unit in class, they first have to be acquainted with its content and approach.

Implications for Future Research

As has been discussed above, some aspects of the curriculum unit can be improved. Further research is required to explore a possible target with more opportunities for the integration of 3D visualization and molecular interactions. Also little adaptations can be incorporated in the curriculum unit and put in practice to explore whether these improve the sequence of the activities, like the enzyme kinetics experiments or more focus on molecular interactions by changing the worksheets. The context ‘drug development against malaria disease’ is chosen in this curriculum unit to integrate 3D visualization and molecular interactions. Based on these results, additional teaching materials can be developed which are focused on other contexts that can be used within MM. For example, girls are more interested in drugs than boys, who on the other hand are more interested in biological and chemical weapons or explosive chemicals (Jidesjo, 2008). Further research should be done to investigate such contexts as well for teaching materials regarding MM.

Acknowledgments

We thank the teachers Nicole Geerlings and Amina el Ouati for their assist during the implementation of the curriculum unit at the Arte College in Almere. Also we would like to thank Ed Morret for his expertise in drug development that importantly assisted the development of the curriculum unit. Finally we give thanks to Marjoleine van Bruggen, who helped in analyzing the data as second researcher.

References

Anderson, A. C., Wright, D. L., (2005). Targeting DHFR in parasitic protozoa. *Drug Discovery Today*, *10*(2), 121-128. Doi: 10.1016/S1359-6446(04)03308-2

Ainly, M. (2012). Students' Interest and Engagement in Classroom Activities. In. S. L. Christenson et al. (Eds.), *Handbook of Research on Student Engagement*. Dordrecht, the Netherlands: Springer Science & Business Media. DOI: 10.1007/978-1-4614-2018-7_13

Barnea, N., & Dori, Y. J. (1996). Computerized Molecular Modeling as a Tool To Improve Chemistry Teaching. *Journal of Chemical Information Computer Sciences*, *36*(4), 629-636. doi: 10.1021/ci950122o

Barnea, N., & Dori, Y. J. (1999). High-school Chemistry Students' Performance and Gender Differences in a Computerized Molecular Modeling Learning Environment. *Journal of Science Education and Technology*, *8*(4), 257-271. doi: 10.1023/A:1009436509753

Bloland, P. B. (2001), Drug resistance in malaria, World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response.

Chitnumsub, P., Maneeruttanarungroj, C., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y., Diagana, T. T. (2010). Preclinical evaluation of the antifolate QN254, 5-chloro- N'6'-(2,5-dimethoxy-benzyl)-quinazoline-2,4,6-triamine, as an antimalarial drug candidate, *Antimicrob Agents Chemother. 56*(6), 2603-2610. Doi: 10.1128/AAC.01526-09

Cody, J. A., Craig, P. A., Loudermilk, A. D., Yacci, P. M., Frisco, S. L., & Milillo, J. R. (2012). Design and Implementation of a Self-Directed Stereochemistry Lesson Using Embedded Virtual Three-Dimensional Images in a Portable Document Format. *Journal of Chemical Education*, *89*(1), 29-33. doi: 10 .12021/ed100441f

College voor Examens (2014). *Scheikunde VWO: Syllabus Centraal Examen 2016 (bij het Nieuwe Examenprogramma): Nader vastgesteld*. Utrecht, the Netherlands: College voor Examens. Retrieved fom: https://www.examenblad .nl/examen/scheikunde-vwo-2/2016/vwo?topparent=vg41h1h4i9qe

Da Cunha, E. F. F., Ramalho, T. C., Maia, E. R., de Alencastro, R. B. (2005), The search for new DHFR inhibitors: a review of patents, *Expert Opinion on Therapeutic Patents, 15*(8), 1-20. Doi: 10.1517/13543776.15.8.967

Dochy, F., Segers, M., Buehl, M. M., (1999). The Relation Between Assessment Practices and Outcomes of Studies: The Case of Research on Prior Knowledge. *Review of Educational Research*, *69*(2), 145-186, doi: 10.3102/00346543069002145

Dori, Y.J., Sasson, I., (2013), A three-attribute transfer skills framework – part I: establishing the model and its relation to chemical education. *Chemistry Education Research and Practice*, 14(363), 363-375. Doi: 10.1039/c3rp20093k

Edelson, D. C., (1998). Realizing authentic science learning through the adaptation of scientific practice. In B. J. Fraser and K. G. Tobin (eds), *International Handbook of Science Education,* Dordrecht: Kluwer, 317–331.

Enckevort, C. (2014). *Students' Learning of Molecular Modeling in Science Education: the Case of Computer-Aided Drug Design Against Malaria Disease*. Paper Research Project University Utrecht.

Flannery, E. L., Chatterjee, A. K., Winzeler, E. A. (2013), Antimalarial drug discovery – approaches and progress towards new medicines, *Nature Reviews*, *11*, 849-862, doi:

Franco, C., Barros, H. L., Colinvaux, D., Krapas, S., Queiroz, G., & Alves, F. (1999). From scientists' and inventors' minds to some scientific and technological products: relationship between theories, models, mental models and conceptions. *International Journal of Science Education, 21*(3), 277-291. doi: 10.1080/095006999290705

Frigg, R., & Hartmann, S. (2006). *Models in Science.* Retrieved from http://plato .stanford.edu/archives/win2013/entries/models-science/

Gilbert, J. K., & Boulter, J. K. C. (1998). Learning science through models and modeling. In B.J. Fraser, & K.G. Tobin (Eds.), *International Handbook of Science Education,* 53-66. Dordrecht, the Netherlands: Springer Science & Business Media.

Gilbert, J. K., Reiner, M., & Nakhleh, M. (Eds.). (2007). *Visualization: Theory and Practice in Science Education: Theory and Practice in Science Education* (Vol. 3). Dordrecht, the Netherlands: Springer Science & Business Media.

Gilbert, J. K., Boulter, J. K. C. (Eds.). (2012). *Developing Models in Science Education,* Springer Science & Business Media.

Gobert, J. D., O'Dwyer, L., Horwitz, P., Buckley, B. C., Levy, S. T., & Wilensky, U. (2011). Examining the Relationship Between Students' Understanding of the Nature of Models and Conceptual Learning in Biology, Physics, and Chemistry. *International Journal of Science Education*, *33*(5), 653-684. doi: 10.108/09500691003720671

Greca, I.M., & Moreira, M.A. (2000). Mental models, conceptual models and modelling. *International Journal of Science Education, 22*(1), 1–11. doi: 10 .1080/095006900289976

Harrison, A. G., & Treagust, D. F. (2000). A typology of school science models. *International Journal of Science Education, 22*(9), 1011-1026. doi: 10.1080 /095006900416884

Hofstein, A., Lunetta, V. N., (2003). Tha Laboratory in Science Education: Foundations for the Twenty-First Century, *Science Education, 88*, 28-54, doi: 10.1002/sce.10106

Jidesjo, A. (2008), Different content orientations in science and technology among primary and secondary boys and girls in Sweden: Implications for the transition from primary to secondary school? *Nordina, 4*(2), 192-208.

Jorgensen, W. L. (2008), Efficient Drug Lead Discovery and Optimization, *Accounts of Chemical Research*, 42(6), 724-733. Doi: 10.1021/ar800236t

Kyndt, E., Dochy, F., Struyven, K., Cascallar, E. (2011), The direct and indirect effect of motivation for learning on students' approaches to learning through the perceptions of workload and task complexity, *Higher Education Research & Development, 30*(2), 135-150, doi: 10.1080/07294360.2010.501329

Landry, Y., Gies. J.P., (2008), Drugs and their molecular targets: an updated overview, *Fundamental & Clinical Pharmacology, 22*(1), p 1-18, doi: 10.1111/j.1472-8206.200700548.x

Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Pearson Education.

Lee, H.S., Butler, N. (2010), Making authentic science accessible to students, *International Journal of Science Education, 25*(8), 923-948 doi: 10.1080/09500690305023

Lijnse, P. L. (1995). 'Developmental research' as a way to empirically based 'didactical structure of science'. *Sciende Education, 79*(2), 189-199.

Lima, L. M., Barreiro, E. J., (2005), Bioisoterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design, *Current Medicinal Chemistry, 12*, 23-49. Doi: 0929-8673/05 S50.00+.00

Lybrand, T. P., (1995), Ligand-protein dociking and rational drug design, *Current Opinion in Structural Biology, 5*, 224-228.

Oda, A., & Takahashi, O. (2009). Validation of ArgusLab efficiencies for binding free energy calculations. *Cheme-bio informatics journal, 9*, 52-61. doi: 10 .1273/cbij.9.52.

Prins, G. T., Bulte, A. M. W., Pilot, A. (2010). Evaluation of a Design Principle for Fostering Students' Epistemological Views on Models and Modelling Using Authentic Practices as Contexts for Learning in Chemistry Education, *International Journal of Science Education*, 1-31, doi: 10.1080/09500693.2010.519405

Renslo, A. R., McKerrow, J. H. (2006), Drug discovery and development for neglected parasitic diseases, *Nature Chemical Biology, 2*(12), doi: 10.1038/nchembio837

Sanders, G. (2012). *Een verkennend onderzoek naar de wijze waarop Molecular Modelling kan worden onderwezen in de klas*. Paper Bachelor Project University Utrecht.

Schlick, T. (2010). *Molecular Modeling and Simulatin: An Interdisciplinary Guide: An Interdisciplinary Guide*. (Vol. 21). Dordrecht, the Netherlands: Springer Science & Business Media. doi: 10.1007/978-1-4419-6351-2

Schwab, J. J. (2962), The teaching of science as enquiry. In J. J. Schwab and P. F. Brandwein (eds), *The Teaching of Science,* Cambridge, MA: Harvard University Press. 3-103.

Sirawaraporn, W., Sathitkul, T., Sirawaraporn, R., Yuthavong, Y., Santi, D. V. (1997). Antifolate-resistant mutants of Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *94*(4), 1124-1129 doi: 0027-8424/97/941124-6$2.00/0

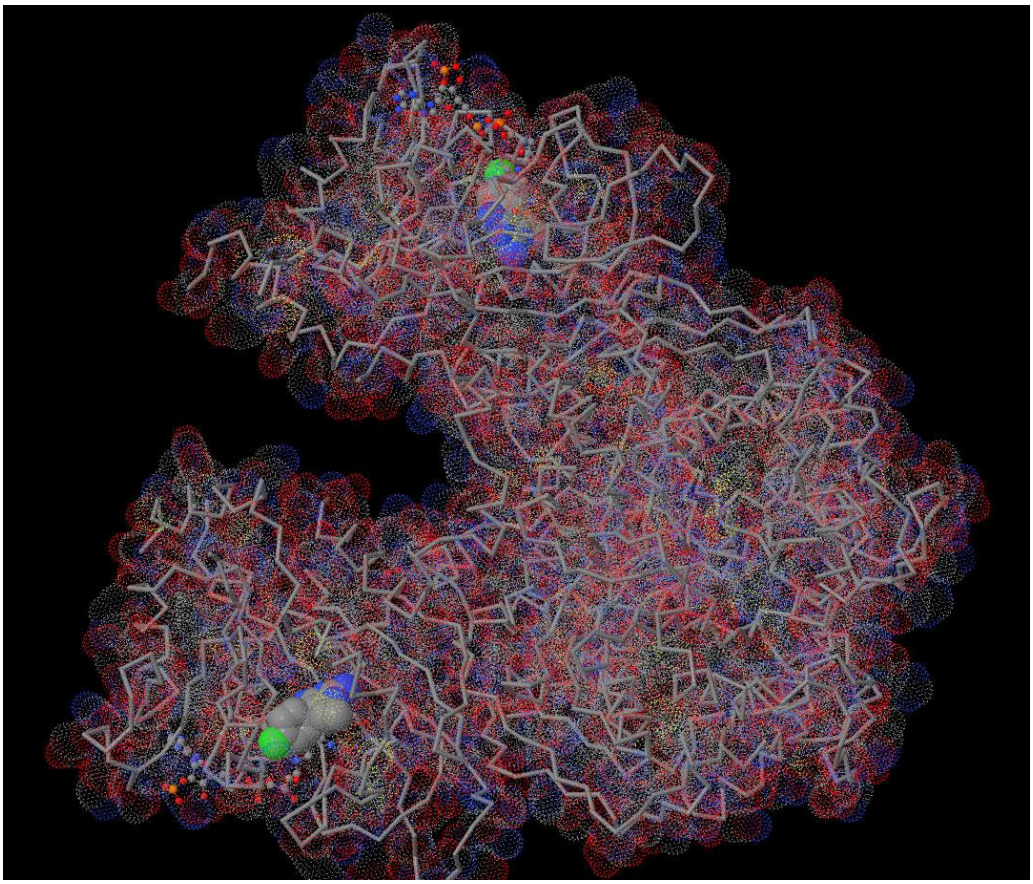
Steel, P. (2007), The nature of procrastination: A meta-analytic and theoretical review of quintessential self-regulatory failure, *Psychological Bulletin, 133*(1), 65-94 doi:10.1037/0033-2909.133.1.65

Vanichtanankul, J., Chitnumsub, P., Kamchonwongpaisan, S., Yuthavong, Y. (2012). Combined Spatial Limitation around Residues 16 and 108 of Plasmodium falciparum Dihydrofolate Reductase Explains Resistance to Cycloguanil. *Antimicrob Agents Chemother. 56*(7), 3928-3935. Doi: 10.1128/AAC.00301-12

Wongsrichanalai, C., Pickard, A. L., Wernsdorfer, W., H., & Meshnick, S. R. (2002). Epidemiology of Drug-Resistant Malaria. *Infectious Diseases*, *2*(4), 209-218. doi: 10.1016/S1473-3099(02)00239-6

Appendix A. Curriculum unit 'Molecular Modeling: drug development against malaria disease'.

Molecular Modeling
Medicijnontwikkeling tegen Malaria



Colofon

Deze lesbrief *Molecular Modeling: Medicijnontwikkeling tegen Malaria* is bestemd voor de lessen scheikunde, bovenbouw VWO.

Deze lesbrief is ontwikkeld in opdracht van het Freudenthal Instituut voor Didactiek van Wiskunde en Natuurwetenschappen, Chemiedidactiek, Universiteit Utrecht door:

- Freudenthal Instituut/Sectie Chemiedidactiek
  - Janske Bode
  - Chrissy van Enckevort
  - Gerret Sanders
  - Gjalt Prins
- Zernike College / Hanzehogeschool Groningen
  - Ton Bominaar

© 2016. Versie 1.6

Voor deze lesbrief geldt een Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl

Het auteursrecht op deze lesbrief berust bij de Universiteit Utrecht, het Freudenthal Instituut voor Didactiek van Wiskunde en Natuurwetenschappen.

De auteurs hebben bij de ontwikkeling van dit materiaal gebruik gemaakt van materiaal van derden. Waar dat is gebeurd, is zo veel mogelijk de bron vermeld. De lesbrief is met zorg samengesteld. De Universiteit Utrecht aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade voortkomend uit (het gebruik van) deze lesbrief.

Aangepaste versies van deze lesbrief mogen alleen verspreid worden, indien in de lesbrief vermeldt wordt dat het een aangepaste versie betreft, onder vermelding van de naam van de auteur(s) van de wijzigingen.

Inhoudsopgave

Colofon 1
Inhoudsopgave 2
Introductie 3
Leerdoelen 3
Hoofdstuk 1. Malaria: een ernstige ziekte 5
Hoofdstuk 2. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen 9
Hoofdstuk 3. Target DHFR onder de loep 13
Hoofdstuk 4. Lead pyrimethamine onder de loep 16
Hoofdstuk 5. Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer 19
Hoofdstuk 6. Op weg naar een geneesmiddel 26
Hoofdstuk 7. Extra opdrachten 29
Bijlage 1 – Woordenlijst 31

Introductie

Medicijnen: de mensheid kan niet zonder! Voor veel ziekten en aandoeningen zijn medicijnen ontwikkeld. Aan de ontwikkeling van een medicijn gaat een jarenlang proces vooraf. In deze module krijg je inzicht in dat proces en ga je zelf aan de slag met medicijnontwikkeling voor de ziekte malaria m.b.v. de techniek Molecular Modeling. Jij kruipt daarbij in de rol van wetenschapper die werkt aan de selectie van stoffen die potentieel geschikt zijn als medicijn tegen malaria.

Deze module is ontworpen naar aanleiding van de vernieuwingen in het scheikundeonderwijs. Molecular modeling heeft hierin een prominente plaats. In de nieuwe syllabus voor VWO Tweede Fase staat de volgende doelstelling rond Molecular modeling:

> ***Examenkandidaten kunnen aan de hand van voorbeelden toelichten welke bijdrage molecular modeling en data-mining leveren aan de ontwikkeling van chemische kennis bij wetenschappelijk onderzoek, productinnovatie of nieuwe maatschappelijke toepassingen.***

Deze module sluit aan op deze doelstelling en geeft inzicht in de kracht van molecular modeling bij de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. De module is onderverdeeld over zeven hoofdstukken. De volledige module beslaat ongeveer 16 lesuren waarbij er vooral in tweetallen gewerkt zal worden. **In de tekst staan regelmatig dik gedrukte woorden. Dit zijn woorden waarvan de betekenis is beschreven in de woordenlijst in Bijlage 1.** In Figuur 1 staat een schematische weergave van de onderverdeling van de lesmodule en de leerdoelen die hier, per hoofdstuk, bij horen.

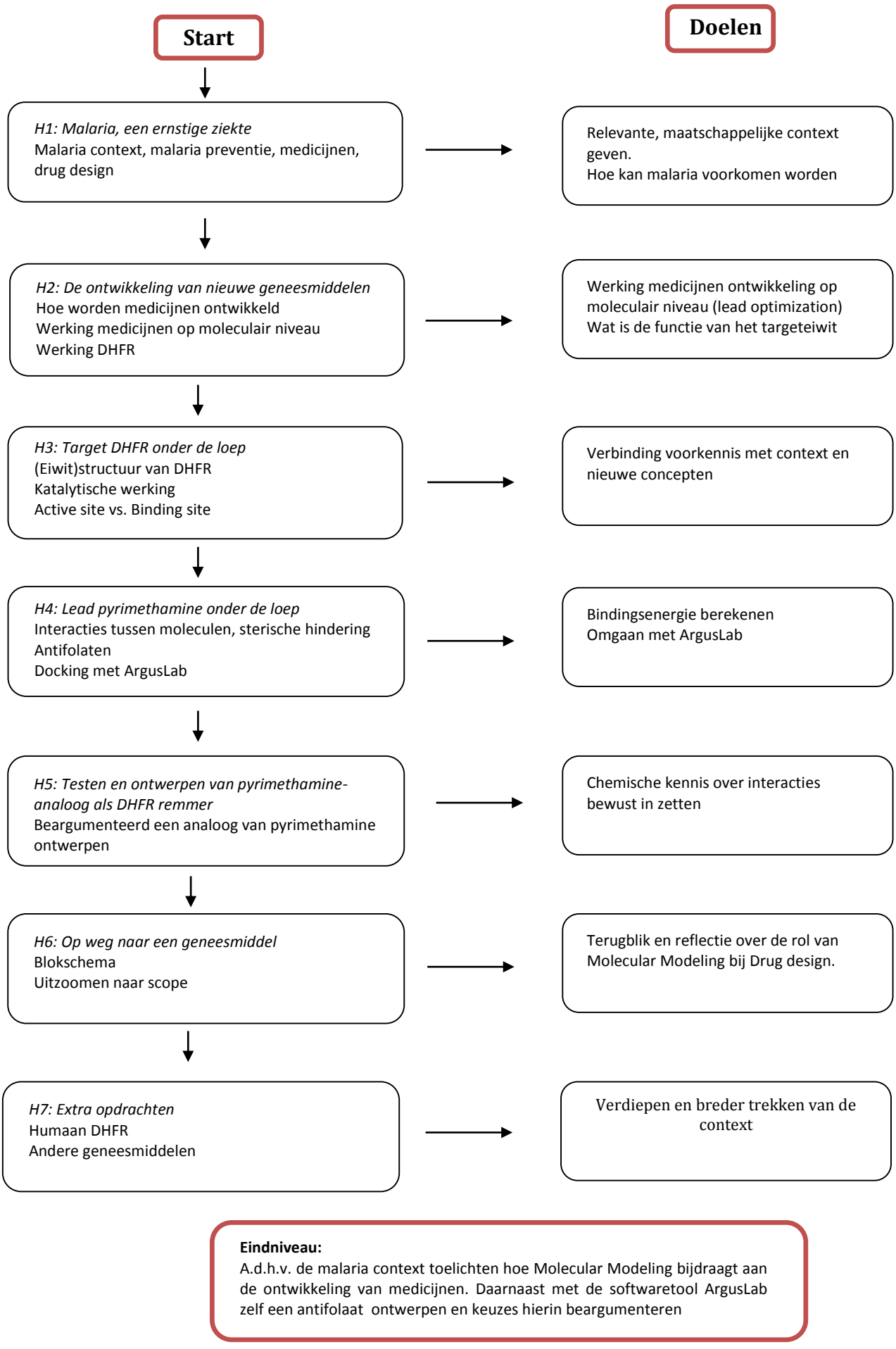
Leerdoelen

Na afronding deze lesmodule kun je:

- Aan de hand van de context malaria uitleggen waarom het belangrijk is nieuwe medicijnen te *blijven* ontwikkelen.

- Uitleggen welke rol **molecular modeling** speelt bij de ontwikkeling van medicijnen en hoe dit proces verloopt.

- De verschillende moleculaire interacties die een rol spelen bij de werking van medicijnen benoemen samen met hun belangrijkste eigenschappen en verklaren hoe deze moleculaire interacties invloed hebben op de werking van een medicijn.

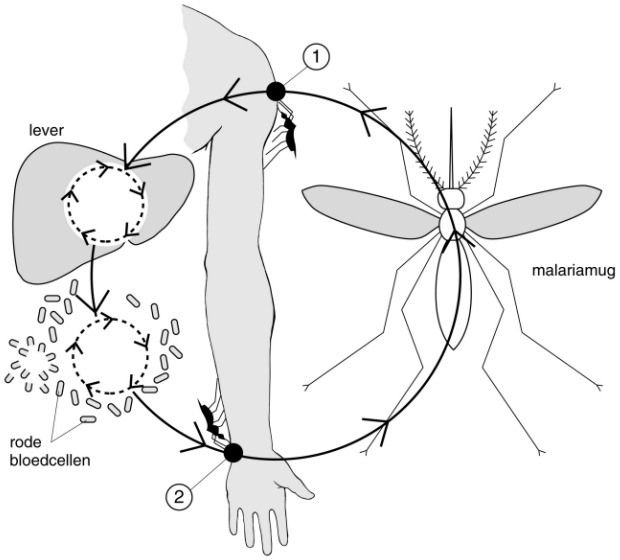


Figuur 1. Schematische weergave van de lesmodule: opbouw en leerdoelen.

Hoofdstuk 1. Malaria: een ernstige ziekte

Malaria is een infectieziekte. **Malariamuggen** zorgen voor de verspreiding van de **malariaparasiet**. De malariaparasiet is een eencellig organisme. Een parasiet heeft een gastheer nodig om te kunnen overleven. Andere bekenden parasieten zijn bijvoorbeeld luizen, vlooien en teken.

In Figuur 2 is schematisch weergegeven hoe de malariaparasiet zich vermeerdert. Wanneer een malariamug een besmet persoon bijt, komt de malariaparasiet in de mug terecht. In het darmkanaal van de mug vermenigvuldigt de malariaparasiet zich en deze parasieten verplaatsen zich vervolgens naar de speekselklieren van de mug. Bij een nieuwe beet door de mug kan de malariaparasiet het lichaam van een gezond mens binnen gaan. De parasiet zal zich naar de lever verplaatsen en daar vermenigvuldigen. Op een zeker moment verplaatst de malariaparasiet zich naar de bloedbaan van de mens. Hier zal de parasiet zich in een rode bloedcel nestelen en zich verder vermeerderen. Wanneer de rode bloedcel sterft zal de parasiet zich in de volgende rode bloedcel nestelen.



Figuur 2. De levenscyclus van de malariaparasiet. Bij (1) wordt de mens gestoken door een met malariaparasieten besmette malariamug. De parasieten vermenigvuldigen zich ten koste van de lever en de rode bloedcellen. Bij (2) wordt de besmette (en soms doodzieke) patiënt gestoken door een nog onbesmette mug, die door het opzuigen van besmet bloed ook geïnfecteerd raakt en vervolgens andere mensen kan besmetten.

Bron:
http://www.medicijnen-op-maat.nl/Verre%20Reizen/malaria.htm

Ziekteverschijnselen die er bij de mens vaak optreden zijn koortsaanvallen, koude rillingen en overgeven. Deze worden veroorzaakt doordat de vermenigvuldiging van de parasieten in de meeste gevallen parallel aan elkaar loopt.

De malariaparasiet tast de lever van de mens aan, dit kan gevolgen hebben voor het functioneren van de lever. Ook het sterven van de rode bloedcellen kan ernstige gevolgen hebben. Bloedvaten kunnen bijvoorbeeld verstopt raken waardoor bepaalde organen niet meer kunnen functioneren. Complicaties die de malariaparasiet veroorzaakt kunnen in het ergste geval de dood tot gevolg hebben.

Er wordt veel aan malariabestrijding (zowel voorkomen als genezen) gedaan, maar het aantal slachtoffers per jaar is nog steeds aanzienlijk. In 2010 zijn er zo'n 655.000 mensen gestorven aan de gevolgen van malaria, vooral jonge kinderen in Afrika. In Afrika, maar ook in andere derde wereld landen, zijn er beperkte financiële middelen en is er een gebrek aan kennis om de malariaparasiet uit te bannen. In totaal zijn er meer dan 200 miljoen mensen die de ziekte hebben.

Activiteit 1: Preventie van malaria

Lees de tekst op pagina 5 over de infectieziekte malaria. Er wordt veel gedaan om de verspreiding van malaria tegen te gaan, zowel door het te voorkomen als het te genezen.

Opdracht: Maak een overzicht van methoden om het krijgen van de ziekte Malaria te *voorkomen*. Noteer enkele voor- en nadelen van de verschillende methoden die je hebt gevonden.

Gebruik onderstaande website als start voor je informatiezoektocht:
WikiPedia: http://nl.wikipedia.org/wiki/Malaria
Gezond op reis: http://www.gezondopreis.nl/Infectieziekten/Malaria.aspx
Tropencentrum AMC: https://www.amc.nl/web/AMC-website/Tropencentrum-AMC/Home.htm

Activiteit 2: Preventieve medicijnen

Tijdens de uitvoering van activiteit 1 ben je waarschijnlijk ook verschillende medicijnen tegengekomen. Er zijn een beperkt aantal geneesmiddelen om malaria te *voorkomen* voorhanden. Hieronder worden een aantal medicijnen genoemd die voor deze **malariaprofylaxe** gebruikt worden. Welke van deze medicijnen voorgeschreven worden, hangt af van het specifieke malariagebied op aarde, de verblijfsduur, de gezondheidstoestand van de betrokken persoon (eventuele zwangerschap) en andere geneesmiddelen die de persoon gebruikt. Alle onderstaande medicijnen zijn **synthetische middelen**.

- Nivaquine® (werkzame stof chloroquine)
- Lariam® (werkzame stof mefloquine)
- Paludrine® (werkzame stof proguanil)
- Malarone™ (werkzame stoffen atovaquon en proguanil)
- Daraprim® (werkzame stof pyrimethamine)

Opdracht: Zoek van elk van bovenstaande medicijnen enkele voor- en nadelen op. Zoek op de naam van het geneesmiddel of op de naam van de werkzame stof.

Gebruik onderstaande websites als start voor je informatiezoektocht:
Malariapillen wereldkaart: http://www.vaccinatiesopreis.nl/malariapillen-wereldkaart/
Apotheken in Nederland: http://www.apotheek.nl/

Wanneer de malariaparasiet al in het lichaam aanwezig is en er ziekte verschijnselen optreden, dan zal bovenstaande vorm van medicatie niet meer voldoende zijn. De malaria moet dan *bestreden* worden. Dit kan gedaan worden door een korte kuur met een hoge dosis van een mix van bovenstaande malariaprofylaxe voor te schrijven. Een arts zal in zo'n geval een kuur voorschrijven en de duur, dosis en mix bepalen.

Activiteit 3: Noodzaak voor nieuwe medicijnen tegen Malaria

We hebben nu gekeken naar de verschillende manieren om nieuwe medicijnen te ontwikkelen. Maar waarom is het nu zo belangrijk dat er constant nieuwe medicijnen tegen Malaria worden ontwikkeld, als er ook al zoveel bestaan? Met behulp van de volgende activiteit ga je dat onderzoeken.

Bestudeer Fragmenten 1 t/m 3 over lopende onderzoeken naar nieuwe medicijnen tegen Malaria. Beantwoord dan de volgende vragen.

a) Waar in het lichaam kan de malariaparasiet zich bevinden? (zie ook Figuur 2)

b) Wetenschappers proberen de mechanismen van de malariaparasiet te ontrafelen om vervolgens gericht medicijnen te kunnen ontwikkelen. Noem een aantal aangrijpingspunten die in de fragmenten zijn genoemd.
c) Waarom is het nodig dat er continu nieuwe medicijnen worden ontwikkeld tegen Malaria? Er zijn meerdere redenen mogelijk.

Fragment 1. Genoom resistente malariaparasiet gekraakt. Bron: http://www.kennislink.nl/publicaties/genoom-resistente-malariaparasiet-gekraakt

6 april 2012

Genoom resistente malariaparasiet gekraakt

De alarmbellen rinkelen: de malariaparasiet begint zich steeds minder aan te trekken van een effectief malariamedicijn. Amerikaanse wetenschappers vonden het gedeelte in het genoom van de parasiet dat betrokken lijkt te zijn bij deze resistentie. Met die kennis hopen ze de resistentie in te kunnen dammen.

In Cambodja en delen van Thailand zijn de malariaparasieten resistent tegen artemisinine. De meest dodelijke soort malariaparasiet, *Plasmodium falciparum*, begint in Zuid-Oost Azië resistent te worden tegen artemisinine: momenteel het meest effectieve geneesmiddel tegen malaria. Thaise wetenschappers en hun Amerikaanse collega's schreven daar deze week over in het medische vakblad *The Lancet*. Ze maken zich zorgen dat resistentie tegen artemisinine onder parasieten zich zal verspreiden naar India en Afrika, zoals het ook ging bij eerdere antimalaria-medicijnen. De bevinding valt samen met een onderzoek dat deze week online verscheen in het tijdschrift *Science*. In dit onderzoek ontdekten dezelfde Amerikaanse wetenschappers – van het *Texas Biomedical Research Institute*, onder leiding van geneticus Tim Anderson – welk deel van het genoom van de malariaparasiet resistentie voor antimalaria-medicijnen veroorzaakt.

Genomen vergelijken

Malaria wordt veroorzaakt door parasieten die via de prik van een besmette mug in je bloed terechtkomen. Het aantal malariadoden is, mede dankzij artemisinine, de laatste tien jaar met zo'n dertig procent afgenomen. In 2010 overleden naar schatting 655.000 mensen aan de ziekte. Nog steeds een enorm aantal. En met een beetje pech gaat dat cijfer weer omhoog, doordat de malariaparasieten in Zuid-Oost Azië zich niet meer zoveel aantrekken van het normaal zo effectieve artemisinine.

Artemisinine

Artemisinine is een stof afkomstig uit de plant zomeralsem (*Artemisia annua), en het werkt als geneesmiddel tegen malaria. Tegenwoordig wordt het medicijn ook geproduceerd door genetisch aangepaste bakkersgist* cerevisiae, die is aangezet artemisinezuur te maken: een voorloperstof voor artemisinine. Om resistentie te voorkomen moet artemisinine in combinatie met andere antimalariamedicijnen worden gebruikt. Maar in Zuid-Oost Azië wordt het medicijn meestal als monotherapie, dus niet in combinatie met de andere geneesmiddelen, verkocht. Om te begrijpen door welke genetische verandering malariaparasieten resistent worden, vergeleken de wetenschappers het genoom van malariaparasieten uit Laos, Cambodja en Thailand met elkaar. Parasieten uit Laos zijn nog gevoelig voor artemisinine, in Cambodja zijn ze resistent, en in Thailand komen beide soorten parasieten voor. Het bleek dat de DNA-lettervolgorde in het genoom van de parasieten op drieëndertig plaatsen erg van elkaar verschilde. Toen de wetenschappers deze stukjes DNA wat gedetailleerder onderzochten in Thaise parasieten, vonden ze één klein gedeelte in het genoom dat verantwoordelijk lijkt te zijn voor het veroorzaken van resistentie tegen artemisinine.

Genen voor resistentie

Welke precieze genetische veranderingen ten grondslag liggen aan de resistente is hiermee nog niet opgehelderd. Op het ontdekte stukje DNA liggen namelijk ongeveer tien genen. Uitzoeken welke van deze genen resistentie in de hand werkt, is de volgende klus. Als we daar eenmaal achter komen, kunnen we aan de slag, schrijft onderzoeker Tim Anderson in een email. "Dan kunnen we een snelle moleculaire test maken, die gebruikt kan worden om te zien hoe wijdverspreid de resistentie is. Ook kunnen we leren begrijpen hoe artemisinine precies werkt – want dat weten we niet – en hoe parasieten resistent worden. Gewapend met deze informatie is het wellicht mogelijk het medicijn zo aan te passen dat het weer effectief wordt". Maar Anderson zegt erbij dat de beste manier om verspreiding van artemisinine-resistentie te voorkomen, is om over te schakelen naar een ander type medicijn. Een combinatie van verschillende typen medicijnen zou helemaal ideaal zijn. "Maar het probleem is dat er geen andere medicijnen beschikbaar zijn, en dat we de ontwikkeling van nieuwe typen medicijnen moeten versnellen." Het is duidelijk: er is geen gemakkelijke oplossing voor de oprukkende resistente parasieten. Met hun onderzoek hopen Anderson en zijn collega's in ieder geval de discussie aan te wakkeren over verschillende strategieën om malaria in toom te houden.

Fragment 2. Een nieuw veelbelovend geneesmiddel tegen malaria. Bron: http://www.bprc.nl/nl/artikel/een-nieuw-veelbelovend-geneesmiddel-tegen-malaria

21 maart 2013

Een nieuw veelbelovend geneesmiddel tegen malaria

Er bestaat slechts een handjevol geneesmiddelen tegen malaria. Resistentie tegen deze geneesmiddelen is een groot probleem en nieuwe geneesmiddelen zijn dan ook hard nodig. In recent onderzoek is een veelbelovende klasse van nieuwe geneesmiddelen geïdentificeerd.

De malaria parasiet is een gecompliceerd organisme met zeer veel uiteenlopende verschijningsvormen. Zo ontwikkelt de parasiet zich in de mug, vervolgens in de lever van een besmet persoon en uiteindelijk vindt vermenigvuldiging plaats in de bloedbaan. Hierbij wordt de besmette persoon ziek. In de bloedbaan van een besmet persoon bevinden zich ook specifieke stadia die door de malariamug worden opgenomen en vervolgens in de mug voor voortplanting van de parasiet zorgen.

Tot nu toe zijn veel antimalaria geneesmiddelen gericht tegen een beperkt aantal verschijningsvormen van de parasiet, meestal de bloedvormen, om ziekte te bestrijden. Een wereldwijd onderzoeksverband van verschillende malaria onderzoeksgroepen, waaronder onderzoekers van het BPRC, hebben nu een nieuwe klasse van geneesmiddelen tegen malaria ontdekt.

In onderzoek in kweekflessen en in knaagdieren blijken deze geneesmiddelen niet alleen zeer actief te zijn tegen de malaria parasietvormen die aanwezig zijn in het bloed, maar ook tegen stadia die in de lever voorkomen en stadia die in de mug kunnen overleven. Deze geneesmiddelen gaan dus niet alleen ziekte tegen, maar voorkomen ook dat de parasiet kan worden overgebracht door de mug. Meer onderzoek is nodig om te testen of dit uiteindelijk ook in de mens het geval is.

Het onderzoek waarbij deze nieuwe klasse van veelbelovende antimalaria middelen is geïdentificeerd is beschreven in het vooraanstaande blad Science Translational Medicine.

Fragment 3. Nieuwe medicijnklasse tegen malaria ontdekt. Bron: http://www.artsennet.nl/Nieuws/Nieuws-onderzoeken/Nieuwsartikel/140263/Nieuwe-medicijnklasse-tegen-malaria-ontdekt.htm.

13 december 2013

Nieuwe medicijnklasse tegen malaria ontdekt

Onderzoekers hebben een compleet nieuwe klasse medicijnen ontdekt tegen malaria. Het middel verstoort een essentieel onderdeel in de stofwisseling van de parasiet en kan zo alle stadia van vermenigvuldiging blokkeren.

De onderzoekers verwachten dat hun ontdekking snel tot nieuwe geneesmiddelen leidt, zo schrijven ze in Nature. Het gaat om imidazopyrazines, een nieuwe klasse van geneesmiddelen.

Bijzonder effectief

De bestrijding van de malariaparasiet is vanwege de ingewikkelde levensloop tamelijk complex. Met imidazopyrazines is het mogelijk om de parasiet in elke fase van zijn ontwikkeling aan te pakken. Niet alleen direct na het binnendringen van het lichaam (preventie), maar ook na het verlaten van de lever (therapie) en bij de overdracht van de mens naar de mug (transmissie).

Werking

'Het middel werkt erg goed in muizen met malaria, maar ook in bloedtesten', zegt Koen Dechering, algemeen directeur van TropIQ Health Sciences. 'Daarnaast hebben Anne-Marie Zeeman en Clemens Kocken van het 'Biomedical primate research centre' (BPRC) bij hogere dieren aangetoond dat het middel ook in de lever werkt. Het middel blokkeert de vermenigvuldiging van parasieten in elke fase van ontwikkeling.'

Zwakke plek ontdekt

Robert Sauerwein, hoogleraar Medische Parasitologie aan het Radboudumc, illustreert hoe het onderzoek een tot voorheen onbekende zwakke plek van de parasiet blootlegt. Sauerwein: 'Onder leiding van Amerikaanse wetenschappers heeft de groep op genetisch, chemisch en biochemisch niveau aangetoond dat de imidazopyrazines het **enzym** PI(4)K remmen. Dit enzym speelt een essentiële rol bij het vervoer van allerlei stoffen in de parasiet. Het blokkeren van PI(4)K stuurt de logistiek die de eencellige parasiet nodig heeft om zich te vermenigvuldigen compleet in de war.'

Bestaande medicijnen

Er zijn al diverse medicijnen tegen malaria, maar vroeg of laat worden parasieten daar resistent voor. Sauerwein: 'Ook tegen artemisinine, het beste medicijn tegen malaria dat we op dit moment hebben, is onlangs resistentie geconstateerd. Dat betekent dat we nu geen middelen meer hebben waarvoor de parasiet niet resistent is. Alleen al daarom is de ontdekking van deze geheel nieuwe klasse aan medicijnen erg belangrijk.'

Hoofdstuk 2. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen

In de praktijk worden er verschillende manieren gebruikt om nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen. In deze module willen we gaan inzoomen op 3 van deze verschillende manieren. Welke manier gebruikt wordt, is o.a. afhankelijk van hoeveel er al bekend is over de ziekte en wat het mechanisme achter de ziekte is. Bij infectieziekten, veroorzaakt door parasieten (zoals bacteriën of virussen) moet bijvoorbeeld een manier worden gevonden om de ziekteverwekker zélf aan te pakken. Daarvoor is het nodig een **essentieel eiwit** van de parasiet, betrokken bij de vermenigvuldiging of het **metabolisme** van de parasiet, te hinderen of te blokkeren zodat de parasiet na verloop van tijd sterft. De zoektocht naar een dergelijk essentieel eiwit heet in het Engels 'target finding'. In het Nederlands wordt dit essentiële parasitaire[7] eiwit ook wel '**doeleiwit'** genoemd.

Manier 1: Whole-cell screening

In het verleden werd hiervoor vooral gebruik gemaakt van 'whole-cell screening'. Dit zijn **in vitro** experimenten waarbij telkens verschillende moleculen aan cellen van organismen worden toegevoegd om te kijken of deze moleculen effect hebben op de vermenigvuldiging of het metabolisme van het organisme. De cellen worden dan **geïncubeerd** met deze stoffen en na een tijdje onderzoeken de wetenschappers wat er is gebeurd met de geselecteerde cellen. Als de vermenigvuldiging of het metabolisme van de cellen inderdaad aangetast wordt, zal het molecuul waarschijnlijk een essentieel eiwit van het organisme hinderen of blokkeren. Als de moleculen in deze geselecteerde cellen worden gelabeld met fluorescente labels, kunnen de wetenschappers ook zien aan welke eiwit het molecuul precies bindt.

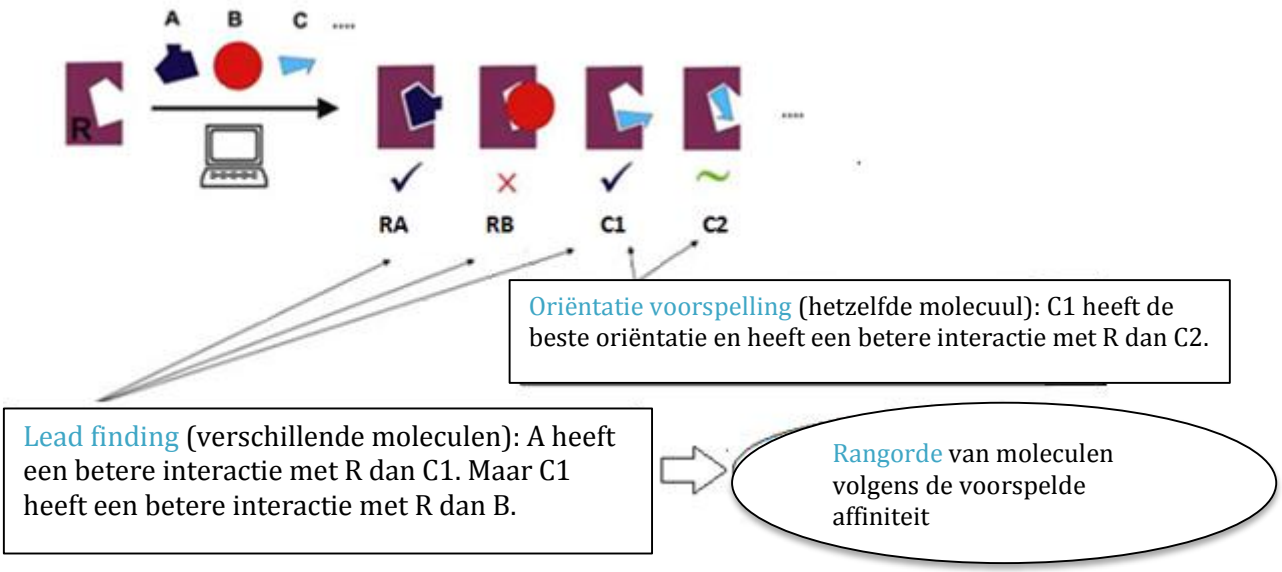
Met de techniek van tegenwoordig is het zelfs mogelijk om duizenden van zulke experimenten tegelijkertijd uit te voeren en zo heel veel verschillende moleculen tegelijkertijd te testen. Deze experimenten vinden dan plaats in zogenaamde *wells*. Dit zijn als het ware micro reageerbuizen waar 1 µL volume in past. Duizenden van zulke wells worden dan naast elkaar gebruikt om de verschillende moleculen op de cellen te testen, waarbij elke well een ander molecuul bevat. Robots worden gebruikt om dit proces automatisch te laten verlopen. Door deze techniek kunnen potentiele moleculen en doeleiwitten steeds sneller gevonden worden.

Manier 2: Target-based screening

Ook kan het zijn dat het doeleiwit van een bepaalde infectieziekte al bekend is, maar dat nog niet ontdekt is welke stof potentieel als medicijn hiertegen gebruikt kan worden. Dan kan er gebruik gemaakt worden van 'target-based screening'. Wetenschappers gaan dan op zoek naar de werkzame stof **(lead)** die heel specifiek alleen dat ene parasitaire doeleiwit blokkeert en zijn biologische activiteit (of zelfs het gehele eiwit) uitschakelt. Dit proces wordt ook wel 'lead finding' genoemd. De lead moet wel heel specifiek alleen het parasitaire doeleiwit blokkeren, anders is er kans op ongewenste bijwerkingen. Immers van een parasitair eiwit is vaak ook een humaan **analoog**.

Het proces van lead finding is schematisch weergegeven in Figuur 3. In eerste instantie kunnen verschillende lead moleculen naast elkaar getest worden om te onderzoeken welk molecuul het beste werkt. Om te kijken of een bepaalde lead goed aan het parasitaire doeleiwit bindt, kan gebruik gemaakt worden van een software programma. In dit programma wordt de lead op alle mogelijke manieren in het doeleiwit geplaatst (docking), en bij elke positie wordt er een meting uitgevoerd om te kijken hoe goed en in welke oriëntatie de lead in het doeleiwit past (scoring).

[7] In deze context praten we over een parasitair eiwit, een doeleiwit kan ook een humaan of bacterieel eiwit zijn.



Figuur 3. Deze afbeelding geeft schematisch het proces van lead finding en oriëntatie voorspelling weer. Het passen van het leadmolecuul in het doeleiwit en vervolgens meten hoe goed de lead en het doeleiwit in elkaar passen wordt 'docking' en 'scoring' genoemd. Het is dus mogelijk om verschillende leads te testen (lead finding), maar het is ook mogelijk om eenzelfde lead in verschillende oriëntaties te testen (oriëntatie voorspelling)[8].

Manier 3: Lead optimization
Wanneer een potentiële lead is gevonden, volgt een fase van 'lead optimization. In deze fase wordt de lead geoptimaliseerd. Het molecuul wordt steeds systematisch iets gewijzigd waardoor zijn fysisch-chemische eigenschappen veranderen en daarmee het enzym hindert in zijn biologische activiteit. Na elke aanpassing wordt nagegaan of de werking van de lead is verbeterd of verslechterd. Hiervoor wordt weer gebruik gemaakt van een software programma om de aangepaste leads te docken en te scoren en zo te kijken of de aanpassing goed is of niet. Het streven is een lead te vinden waarvan de werking optimaal is en de bijwerkingen minimaal. Dit houdt o.a. in dat de lead goed aan het parasitaire doeleiwit bindt, maar slecht aan het analoge humane eiwit.

[8] Bron: Romano T. Kroemer (2007). Structure-Based Drug Design: Docking and Scoring. *Current Protein and Peptide Science, 8,* 312-328. http://www.utdallas.edu/~son051000/comp/Docking_and_Scoring1.pdf

Activiteit 4: Verschillende manieren van aanpak

Opdracht: Maak een mindmap waarbij de *ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen* centraal staat. In deze mindmap moeten de 3 verschillende manieren van aanpak die in hoofdstuk 2 besproken zijn in ieder geval terugkomen. Hiervoor ga je informatie op internet opzoeken. Als je andere manieren vindt, kun je deze ook aan je mindmap toevoegen. Denk voor deze opdracht bijvoorbeeld aan de volgende vragen:

- Wat zijn de voor- en nadelen van de verschillende manieren?
- Wat zijn de randvoorwaarden voor het gebruik van de verschillende manieren van aanpak?

Lees de inleidende tekst van hoofdstuk 2. Gebruik verder onderstaande website als start voor je informatiezoektocht. Het artikel kun je opzoeken met behulp van de titel.

WikiPedia: https://en.wikipedia.org/wiki/High-content_screening
https://en.wikipedia.org/wiki/Hit_to_lead

Artikel: Back to the future: lessons learned in modern target-based and whole cell lead optimization of antimalarials (door A.K. Chatterjee).

Activiteit 5: Affiniteit inhibitor met enzym

In Figuur 3 is de *lead finding* schematisch beschreven. Bestudeer in Figuur 3 enzym R en de inhibitors A, B en C nauwgezet. Het is te verwachten dat 1 van de inhibitors de beste affiniteit met enzym R heeft.

a) Doe een uitspraak over welke van de inhibitors van figuur 3 de beste affiniteit heeft met enzym R. Motiveer je antwoord.
b) Welke andere factoren kun je bedenken die van invloed zijn op de binding van een inhibitor aan een enzym?

Activiteit 6: Lead optimization van pyrimethamine

In activiteit 2 heb je van een aantal **malariaprofylaxe** de voor- en nadelen uitgezocht. De werkzame stoffen (leads) in die geneesmiddelen zijn bijvoorbeeld chloroquine, proguanil en pyrimethamine. Van sommige van deze leads is de werking op moleculaire schaal niet geheel bekend. Voor pyrimethamine is de werking wel in detail bekend. Het doeleiwit van pyrimethamine is het parasitaire eiwit *dihydrofolaat reductase* (DHFR). DHFR is een essentieel eiwit voor de vermenigvuldiging van de malariaparasiet.

a) Wat is de functie van DHFR in de cel? Welk cellulair proces wordt door DHFR gekatalyseerd? Waarom is DHFR een essentieel eiwit voor het voortbestaan van de cel? Gebruik onderstaande websites om een antwoord te verkrijgen op de vraag:

Wikipedia http://en.wikipedia.org/wiki/Dihydrofolate_reductase
Tocrisbioscience
http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=187788&Information=True#.U1-Ruvl_tCh

Pyrimethamine wordt echter steeds minder toegepast als geneesmiddel tegen malaria. De reden hiervoor is dat vele parasieten **resistent** zijn geworden voor pyrimethamine. Het parasitaire DHFR enzym heeft namelijk veranderingen ondergaan waardoor pyrimethamine minder goed (of niet meer) als **inhibitor** van DHFR functioneert. Er is al veel onderzoek gedaan naar DHFR, en de werking van pyrimethamine is in detail onderzocht. Zowel het doeleiwit (DHFR) als de lead (pyrimethamine) zijn dus bekend.

b) Beargumenteer waarom lead optimization een passende manier van aanpak is gezien wat we al weten over pyrimethamine en DHFR.

Door pyrimethamine aan te passen, kun je een lead maken die ook geschikt is voor parasieten die resistent geworden zijn voor pyrimethamine zelf. In Fragment 4 staat de opdracht van deze module: *Lead optimization van pyrimethamine.* Lees dit fragment door en kijk nog eens terug naar je antwoorden van activiteit 5.

c) Maak een stappenplan voor de uitvoering van deze opdracht en beargumenteer de stappen. Denk daarbij aan onderstaande aspecten:

- Welke informatie moet er worden ingewonnen?
- Wat moet er allemaal worden uitgezocht?
- Welke experimenten moeten er worden uitgevoerd?

Fragment 4. De opdracht; Lead optimization van pyrimethamine.

De voorheen werkzame stof pyrimethamine wordt steeds minder vaak toegepast in medicijnen. Vele malariaparasieten zijn inmiddels resistent geworden voor pyrimethamine. Door gerichte lead optimization van pyrimethamine kan wellicht een **analoog** worden gevonden die in staat is mutanten van parasitaire DHFR (in voldoende mate) te blokkeren, maar tegelijk het humane DHFR ongemoeid te laten. Dergelijke analogen zijn in potentie geschikt om te gebruiken in medicijnen tegen malaria.

De lead optimization zal gericht zijn op onderstaande DHFR mutanten:
- Wild-Type (Plasmodium falciparum), PDB code 1j3i;
- Double mutant (C59R + S108N), PDB code 1j3j;
- Quadruple mutant (N51I + C59R + S108N + I164L), PDB code 1j3k.

Een wildtype is een variant zoals deze in de natuur voorkomt. Een mutant is een, door de natuur aangepaste versie, van het wildtype. In de primaire structuur is een aantal aminozuren verschil tussen de mutant en het wildtype.
Uiteraard dient de pyrimethamine-analoog het humane DHFR, de menselijke versie van het eiwit, ongemoeid te laten. DHFR is immers ook essentieel voor het voortbestaan van de humane cel.

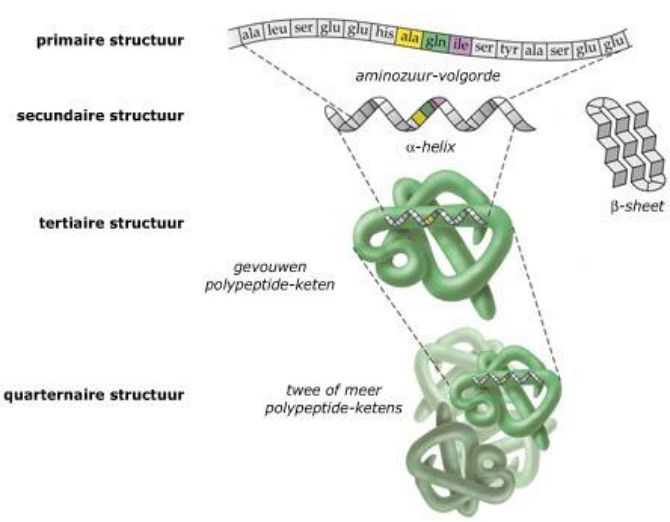
De opdracht luidt:
Test en ontwerp één analoog (of meerdere analogen) van pyrimethamine die bovenstaande mutanten van parasitair DHFR (in voldoende mate) blokkeert, maar het humane DHFR (PDB code 3s7a) niet.

Hoofdstuk 3. Target DHFR onder de loep

Om de hoofdopdracht uit te kunnen voeren is het van belang om eerst een beeld te krijgen van het parasitaire target DHFR. Er zijn in de loop van de tijd verschillende mutanten van DHFR ontstaan, waardoor pyrimethamine niet meer goed werkt. In dit hoofdstuk ga je kijken naar de structuur van DHFR, met bijzondere aandacht voor de bindingsite van pyrimethamine. Maar voordat we het target DHFR onder de loop nemen, is het goed om eerst even te kijken naar de structuur van eiwitten in het algemeen.

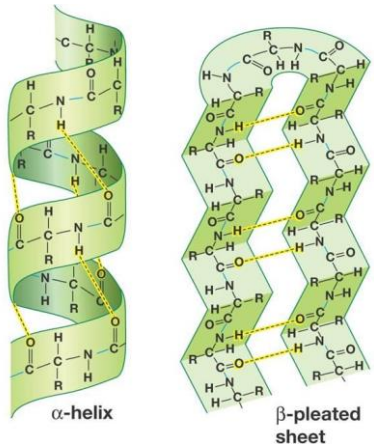
De structuur van eiwitten
De opbouw van een eiwit kun je beschouwen in een aantal aparte deelstructuren. In Figuur 4 staan deze deelstructuren weergeven.

Eiwitten (enzymen) bestaan uit een langere reeks aminozuren, voor te stellen als een kralensnoer. De aminozuren zijn aan elkaar verbonden door **peptidebindingen**. Er zijn in totaal 20 verschillende soorten aminozuren. In Binas Tabel 67C staan alle aminozuren afgebeeld. De volgorde en het aantal van de aminozuren in een eiwit noemen we de *primaire structuur* van het eiwit. De primaire structuur is dus een streng aan elkaar gekoppelde aminozuren in een bepaalde volgorde. De primaire structuur is karakteristiek voor elk eiwit. Een eiwit bestaat al snel uit een reeks van een paar honderd aminozuren aan elkaar. Je kunt je dus voorstellen hoeveel verschillende soorten eiwitten er mogelijk zijn!



Figuur 4. Deelstructuren van eiwitten.
Bron: www.allesoverdna.nl

De primaire structuur van een eiwit kan op een aantal manieren een ruimtelijke vorm aannemen, de *secundaire structuur.* Zo kan de streng aminozuren de vorm van een spiraal hebben (α-helix) of de vorm van een glooiend vlak (β-sheet). In Figuur 5 staan de α-helix en β-sheet afgebeeld. Het glooiende vlak bij de β-sheet ontstaat doordat de polypeptideketens lussen vormt. De spiraal- en vlak-structuren worden door waterstofbruggen in hun ruimtelijke vorm gehouden (deze zijn aangegeven met de gele stippellijnentjes in figuur 5).



Figuur 5. De α-helix en β-sheet
Bron: www.studyblue.com

Ook de helixen en de β-sheets van de secundaire structuur kunnen een ruimtelijke vorm aannemen. Zo kan de *tertiaire structuur* een vezel- of kluwenstructuur aannemen. Bij de tertiaire structuur spelen waterstofbruggen en zwavelbruggen een grote rol. Zwavelbruggen zijn **atoombindingen** die kunnen optreden tussen twee zwavelatomen van cysteïne aminozuren. Deze aminozuren zijn binnen de keten (primaire structuur) vaak ver van elkaar verwijderd, maar komen door de tertiaire structuur dicht bij elkaar te liggen.
Als een eiwit is opgebouwd uit een aantal sub-eenheden, spreken we van een *quaternaire structuur*. Veel eiwitten (zoals enzymen) hebben een dergelijke structuur. Uiteindelijk bepaalt de volgorde van de aminozuren (de primaire structuur) dus wat de quaternaire structuur wordt en wat de 3D structuur van het eiwit precies is.

Activiteit 7: De 3D structuur van DHFR

Van veel eiwitten is de 3D structuur onderzocht, deze zijn online te vinden in de Protein Data Bank (PDB). Op http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do is deze databank te vinden. Op deze website zijn de eiwitstructuren en specificaties van 100.000 eiwitten beschikbaar. We gaan in dit project verschillende eiwitten van deze databank gebruiken. In deze activiteit maak je voor het eerst kennis met het softwareprogramma ArgusLab en de Protein Data Bank.

Opdracht: Bezoek de Protein Data Bank en zoek het DHFR eiwit op. Dit kun je doen door te zoeken op de code van wildtype DHFR: 1j3i. Kijk vervolgens eens wat rond op de PDB site om te zien wat voor informatie je over het DHFR eiwit kunt vinden.

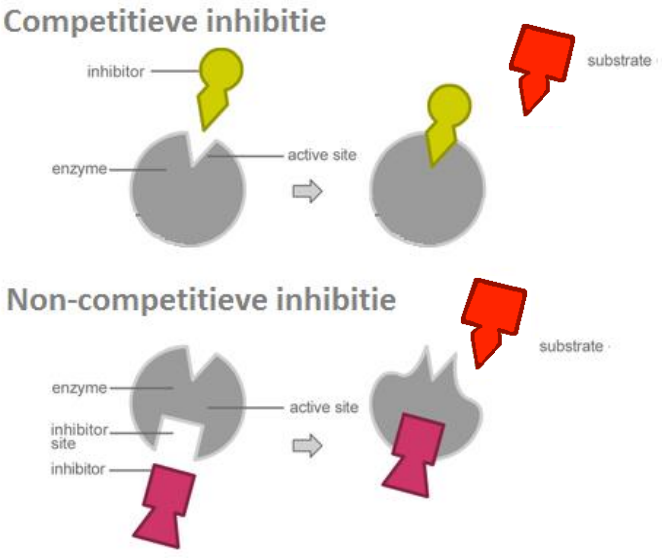
a) Uit hoeveel aminozuren bestaat het DHFR eiwit?

Laad de structuur van wildtype DHFR (PDB code 1j3i) in Arguslab en zoom in op de *primaire*, *secondaire*, *tertiaire* en *quarternaire* structuur. Gebruik hiervoor het software programma ArgusLab, dit programma staat al op de computer geïnstalleerd. In de manual, die je ook uitgereikt hebt gekregen, staat de procedure die je moet volgen om deze opdracht uit te kunnen voeren.

b) Uit hoeveel ketens bestaat het DHFR eiwit?

Het enzym DHFR is betrokken bij de synthese van thymidylaat, een bouwsteen dat nodig is voor de synthese van DNA (zie activiteit 5). Enzymen zijn katalysatoren die de snelheid van een specifieke chemische omzetting verhogen. Ieder enzym bevat een katalytisch centrum (= **active site**) waarin de omzetting daadwerkelijk plaatsvindt. Het katalytisch centrum wordt gevormd door een aantal aminozuren. Wil het enzym zijn functie kunnen uitoefenen, dan moet er tussen **enzym** en **substraat** een kort en hecht contact zijn. Wanneer een ander molecuul (de inhibitor) bindt aan het katalytisch centrum, dan wordt de werking van het enzym gehinderd. Er is dan sprake van concurrentie tussen het substraat en een ander molecuul om de plek in het katalytisch centrum, er wordt dan gesproken over **competitieve inhibitie**. Het competitieve molecuul bindt met het enzym en zorgt ervoor dat het normale substraat niet kan binden aan het enzym, waardoor de reactie wordt verhinderd (zie Figuur 6)

Een andere mogelijkheid is dat de inhibitor niet in het katalytisch centrum maar op een ander plek aan het enzym bindt. In dat geval wordt gesproken van een **non-competitieve inhibitie**. Door de binding van de inhibitor aan het enzym verandert de structuur van het enzym en wordt zo de werking geremd of verhinderd omdat het substraat niet goed meer kan binden aan het enzym. Er kan dus geen 'sleutel slot' principe meer plaatsvinden tussen het substraat en het enzym (sleutel = *substraat* en slot = *active site*).



Figuur 6. Schematische weergave van inhibitie
Bron: www.wikipedia.org/wiki/inhibitie_(scheikunde) (aangepast)

Activiteit 8: De pyrimethamine bindingsite van DHFR

De bindingsite is de plek waar de lead aan het target bindt en de active site is de plek waar het target bepaalde reacties katalyseert. De **bindingsite** en active site hoeven dus niet altijd gelijk aan elkaar te zijn. Voor gerichte lead optimization van pyrimethamine is het noodzakelijk te weten op welke plaats pyrimethamine zich bindt aan DHFR. De bindingsite van pyrimethamine aan DHFR is bepaald door kristallen te maken van pyrimethamine gebonden aan DHFR. Pyrimethamine bindt aan de active site van DHFR, dus in dit geval zijn de bindingsite en de active site wel gelijk aan elkaar. Voor **wildtype** DHFR wordt de bindingssite (dus ook de active site) gevormd door aminozuur residuen Ile-14, Cys-15, Asp-54, Phe-58, Pro-113, Ile-164[9].

Zoals je weet, is een eiwit een lange keten van aminozuren die met peptideverbindingen aan elkaar verbonden zijn. Elk aminozuur heeft zijn eigen plek binnen het eiwit. De cijfers achter de aminozuren geven de plek van het aminozuur in de keten aan. Zo is bijvoorbeeld het 14e aminozuur van DHFR Isoleucine (Ile-14). De volgende vragen gaan over de bindingsite en welke aminozuren in de bindingsite aanwezig zijn.

a) Hoe noem je de vorm van inhibitie van pyrimethamine aan DHFR? Geef een toelichting op je antwoord.

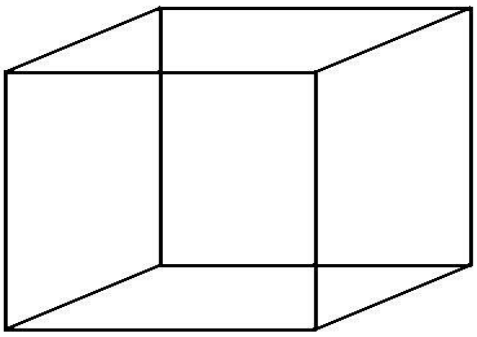
b) Zoek in Binas Tabel 67C de structuurformules op van de aminozuren die de bindingsite vormen. Bekijk de **functionele groepen** van deze aminozuren en geef aan welke moleculaire interacties er mogelijk zijn. Focus vooral op de *restgroepen* van de aminozuren.

c) Je krijgt van je docent een werkblad waarop de bindingssite van DHFR in 2D weergegeven is. Geef op dit werkblad aan waar de mogelijke moleculaire interacties die je bij vraag b gevonden hebt, zich bevinden.

Nu gaan we met behulp van het programma Arguslab kijken naar de 3D structuur van de bindingssite. Zoom in op de bindingsite van pyrimethamine m.b.v. het software programma ArgusLab. In de manual staat de procedure beschreven.

d) Geef schematisch weer waar de verschillende aminozuren van de bindingsite zich t.o.v. elkaar bevinden. Gebruik eventueel een kubus (zie Figuur 7) om de positie van de aminozuren en functionele groepen t.o.v. van elkaar weer te geven. Dit kan helpen om een goed inzicht te krijgen in de 3D structuur van de bindingssite.

e) Vergelijk de 3D structuur van vraag d met de 2D structuur van vraag c. Geef aan wat je opvalt aan deze verschillende weergaven en geef aan wat de toegevoegde waarde is van de 3D structuur.



Figuur 7. Teken de aminozuren schematisch in de kubus.

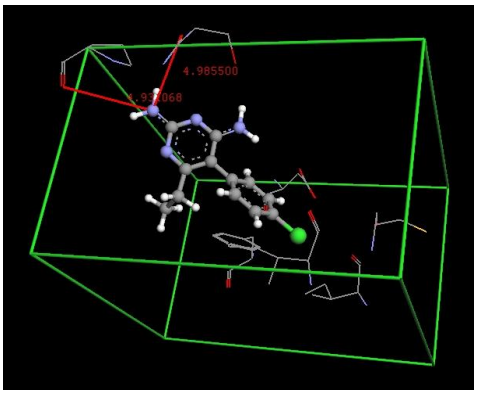
[9] Bron 2: Yuvaniyama J., Chitnumsub P., Kamchonwongpaisan S., Vanichtanankul J., Sirawaraporn W., Taylor P., Walkinshaw M.D., Yuthavong Y. (2003). Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nat. Struct. Biol. 10*(*5*), 357-65.

Hoofdstuk 4. Lead pyrimethamine onder de loep

Voor een molecuul dat zich bindt in de active site van een enzym zijn twee aspecten van belang. Ten eerste moet het molecuul goed passen in de active site. Wanneer een stof te groot is voor de active site dan past hij niet meer en wordt er van **sterische hindering** gesproken.
Daarnaast spelen moleculaire **interacties** een belangrijke rol. Bij een interactie 'bindt' een molecuul aan een ander molecuul. De meeste interacties worden veroorzaakt door een combinatie van verschillende krachten:

- Elektrostatische aantrekking (waterstofbruggen);
- Polaire interacties (zoals ion-dipool of dipool-dipool);
- Hydrofobe interacties (apolair).

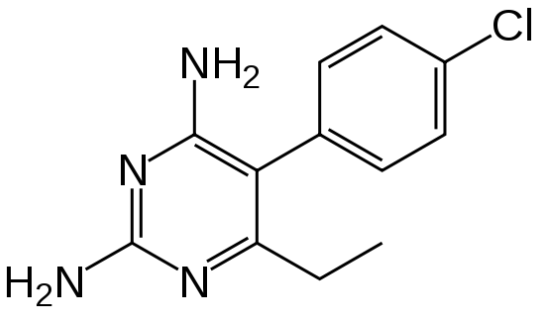
Pyrimethamine
Pyrimethamine is een van de **antifolaten** die regelmatig in de medicijnen tegen malaria voorkomt en wordt gebruikt voor de remming van DHFR (zie figuren 8 en 9). Antifolaten zijn een groep van stoffen die de werking van het enzym DHFR blokkeren door een interactie met dit enzym aan te gaan. Zo zijn er ook andere antifolaten bekend, zoals bijvoorbeeld proguanil. Proguanil heeft vervelende bijwerkingen: het veroorzaakt bij mensen angstgevoelens en andere negatieve emoties. Het nadeel van pyrimethamine is dat veel malariaparasieten resistent zijn geworden voor dit middel.



Figuur 8. Pyrimethamine gedockt in de bindingsite van DHFR.

In Figuur 8 staat in een model weergegeven hoe pyrimethamine een interactie aangaat met de bindingsite van DHFR (wat dus tegelijkertijd in dit geval ook de active site is). In de afbeelding zie je een aantal aminozuren om pyrimethamine heen, verbonden met rode lijntjes. Deze lijntjes stellen de waterstofbruggen voor die tussen pyrimethamine en DHFR worden gevormd.

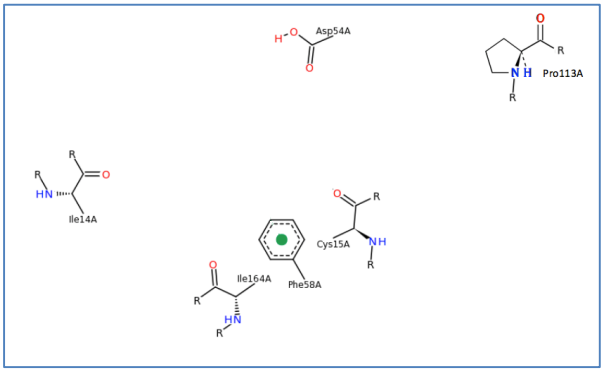
De interactie tussen pyrimethamine en DHFR valt te berekenen in een bindingsenergie. Voor pyrimethamine en wildtype DHFR geldt een **bindingsenergie** van ca. -10 kcal/mol. Hoe lager de bindingsenergie, hoe sterker de interactie tussen pyrimethamine en DHFR is. Ter vergelijking, de bindingsenergie tussen de chlooratomen in Cl_2 is zo'n -57 kcal/mol, en dat is maar één binding. In dit geval van Cl_2 spreken we wel van een **covalente binding**, omdat de twee Chloor atomen echt aan elkaar gebonden zitten; het is een binding *in* het molecuul. Bij de interactie tussen pyrimethamine en DHFR is er alleen sprake van niet-covalente bindingen, zoals waterstofbruggen, elektrosta-tische aantrekking en hydrofobe interacties; dit zijn interacties die plaatsvinden *tussen* de moleculen. Waterstofbruggen hebben bijvoorbeeld een bindingsenergie van zo'n -5 kcal/mol. De interacties tussen een enzym en een substraat of antifolaat zijn *zwakker* dan covalente (atoom)bindingen, maar *sterker* dan een enkele waterstofbrug.



Figuur 9. Structuurformule van Pvrimethamine

Activiteit 9: Binding van pyrimethamine aan wild type DHFR 1j3i.
Opdracht: Bouw het molecuul pyrimethamine in Arguslab zoals dit in de manual staat beschreven.

a) Op basis van de antwoorden bij activiteit 8 kun je een voorspelling doen over de interacties tussen pyrimethamine en de aminozuren in de DHFR bindingssite. Welke interacties zijn mogelijk tussen pyrimethamine en de bindingssite van DHFR? Teken hiervoor pyrimethamine op het werkblad dat je van je docent krijgt. Denk na over de oriëntatie van pyrimethamine in de bindingssite. Geef vervolgens aan *waar* en *welke* interacties er mogelijk zijn tussen pyrimethamine en DHFR. Dit werkblad er hetzelfde uit als het plaatje hiernaast.



Figuur 10. Voorbeeld werkblad: ziet

Activiteit 10: Docken van pyrimethamine aan wild type DHFR 1j3i

Opdracht: Dock pyrimethamine aan de bindingsite van wildtype DHFR 1j3i m.b.v. ArgusLab. In de manual staat de procedure om dit in ArgusLab te doen.

a) Wat is bij de binding van pyrimethamine aan wildtype DHFR 1j3i de meest gunstige pose? Wat is de bindingsenergie (in kcal/mol) bij die pose?

b) Vergelijk deze pose ook met de oriëntatie die je bij activiteit 9 had getekend. Vergelijk ook de interacties die je verwacht had te vinden tussen pyrimethamine en DHFR. Kun je deze interacties terugvinden? Zo nee, welke interacties zijn er anders dan je had verwacht? Of mis je bepaalde interacties? Kun je dit verklaren?

Activiteit 11: Interacties bij enzym-substraat complex

We hebben nu van wildtype DHFR een docking uitgevoerd aan pyrimethamine en berekend wat de bindingsenergie is. In deze activiteit ga je onderzoeken wat je nu precies kunt zeggen over deze bindingsenergie.

Opdracht: Lees fragment 5 en beantwoord de volgende vragen:

a) Geef de evenwichtsvoorwaarde voor de vorming van het enzym-substraat complex.

b) Welke eigenschappen van 1) het substraat en 2) het enzym zouden invloed hebben op vorming van dit enzym-substraat complex?

c) Geef de evenwichtsvoorwaarde voor de vorming van het enzym-inhibitor complex. Wat gebeurt er met de concentratie van het enzym-substraat complex als er een inhibitor van het enzym toegevoegd wordt?

d) Waarom is de bindingsenergie die je gevonden hebt bij activiteit 10 een negatief getal? Wat kun je zeggen over de hoeveelheid energie die het kost om een binding te vormen dan wel dezelfde binding te verbreken?

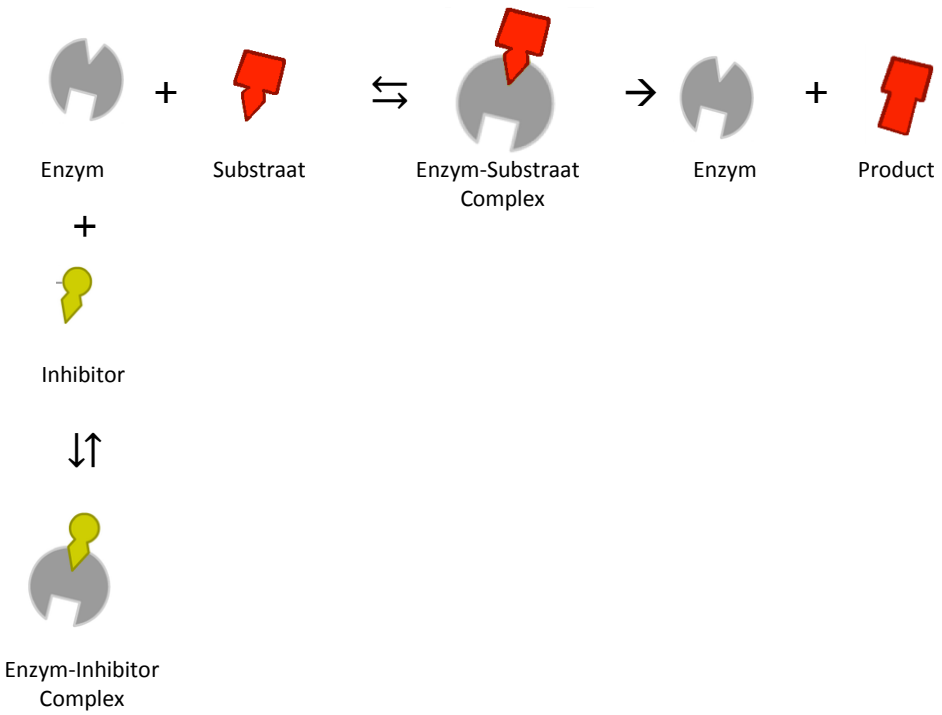
e) Zou de werking van een inhibitor optimaal zijn bij een *grote* of *kleine* waarde van *Ki*? Leg je antwoord uit.

f) Leg uit dat een lage *Ki* correspondeert met een relatief lage bindingsenergie (zo negatief mogelijk) tussen enzym en inhibitor.

Fragment 5: Enzym-Substraat complex en Enzym-Inhibitor Complex

Voor de omzetting van een substraat in het product moet het enzym heel kort met het substraat binden waarbij ze een enzym-substraat complex vormen. Dit gebeurt in de active site van het enzym. Nadat het product gevormd is, laat het enzym weer los en kan het enzym direct weer met een ander substraat binden voor een nieuwe reactie.

Zoals je hebt gezien, is er bij het enzym DHFR spraken van *competitieve inhibitie* wanneer pyrimethamine als inhibitor toegevoegd wordt: pyrimethamine bindt met DHFR en zorgt ervoor dat het normale substraat niet kan binden aan het enzym, waardoor de reactie wordt verhinderd. Om te kijken of een inhibitor goed werkt, kan gekeken worden naar de werking van het enzym waarvoor de inhibitor bedoeld is. In zo'n geval wordt er onderzocht in hoeverre het substraat door het enzym omgezet wordt in het product. De hoeveelheid product die gevormd wordt tijdens deze reactie is namelijk een maat voor de werking van de inhibitor. Als er veel substraat wordt omgezet in het product, zal de inhibitor niet goed werken. Maar als er vrijwel geen product gevormd wordt, dan zal de inhibitor goed z'n werk gedaan hebben en dus het enzym goed kunnen remmen. In onderstaand figuur zie je een overzicht van dit proces.



De snelheid van de reactie tussen enzym en inhibitor kan omgezet worden in een zogenaamde *Ki* waarde. Deze waarde staat namelijk voor de *dissociatie constante* en geeft aan in hoeverre het enzym en de inhibitor aan elkaar gebonden zijn of niet. Een grote waarde van *Ki* betekent dat het enzym en de inhibitor veel gedissocieerd zijn en bij een kleine waarde van *Ki* zijn juist veel inhibitors gebonden aan de enzymen.
De vorming van het enzym-inhibitor complex wordt in bovenstaand figuur (rechts) beschreven. Het is dus een evenwichtsreactie. Afhankelijk van hoe goed de inhibitor werkt, zal het evenwicht meer aan de linkerkant of aan de rechterkant liggen.
De dissociatie constante *Ki* wordt gedefinieerd als:

$$Ki = \frac{[E] * [I]}{[EI]}$$

waarbij [E], [I] en [EI] overeenkomen met de concentraties van respectievelijk het enzym, de inhibitor en het enzym-inhibitor complex. Als de totale concentratie van het enzym voor de helft gebonden is aan de inhibitor en de andere helft ongebonden is, komt de waarde van *Ki* overeen met de concentratie van de inhibitor.

Hoofdstuk 5. Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer

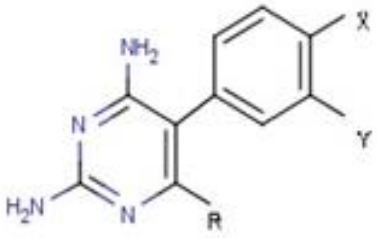
Activiteit 12: Docken van double mutant DHFR 1j3j

DHFR double mutant 1j3j heeft twee mutaties ondergaan en heeft qua 3D structuur dus wijzigingen t.o.v. wildtype DHFR 1j3i. Deze wijzigingen bij deze mutant bevinden zich *buiten* de bindingssite, maar het kan in zo'n geval wel mogelijk zijn dat de bindingssite door de mutaties iets anders opgebouwd is.

Opdracht: Voer de docking ook uit voor de double mutant DHFR 1j3j. Ook deze DHFR variant kun je via de Protein Data Bank openen in ArgusLab. Voer hiervoor dezelfde stappen uit zoals je bij activiteit 7 voor DHFR wildtype hebt gedaan, alleen nu voor mutant DHFR 1j3j. De aminozuren die de bindingsite vormen voor de DHFR mutant bevinden zich op dezelfde plek als bij het wildtype DHFR.

a) Wat is bij de binding van pyrimethamine aan double mutant DHFR 1j3j de meest gunstige pose? Wat is de bindingsenergie (in kcal/mol) bij die pose?
b) Is er verschil in de berekende bindingsenergieën tussen het wildtype DHFR (zie activiteit 10) en deze mutant? Zo ja, wat zijn deze verschillen? Is er een verschil in de meest gunstige pose bij wildtype DHFR en double mutant DHFR? Kun je dit verklaren?

Met lead optimization van pyrimethamine bedoelen we het gericht (**functionele**) groepen vervangen, toevoegen aan of verwijderen van pyrimethamine om zo analogen van pyrimethamine te maken. Vervolgens moet de relatieve bindingsenergie berekend worden aan de verschillende varianten van DHFR om te kijken of het goede analogen zijn. In tabel 1 zie je twee voorbeelden van deze analogen. Hierbij zijn op plek X, Y en R functionele groepen vervangen, toegevoegd of verwijderd van pyrimethamine (zie figuur 11 en tabel 1).



Figuur 11. Basisstructuur (voor Pyrimethamine geldt: R = CH_2CH_3; X = Cl; Y= H)

Activiteit 13: Testen van pyrimethamine-analogen

a) Hoe is de structuur van pyrimethamine veranderd bij de twee analogen uit tabel 1? Teken hiervoor de structuur van beide analogen.

b) Test deze pyrimethamine-analogen. Volg de aanwijzingen van de docent op over welke analogen en welke mutanten je moet testen (je hoeft ze namelijk niet allemaal te doen). Bereken de bindingsenergie met Arguslab en gebruik hierbij de (nieuw opgedane) kennis en de achtergrondinformatie die je tot nu toe hebt gekregen en behandeld in deze module. Noteer je resultaten in tabel 1.

Tabel 1. Relatieve bindingsenergieën van pyrimethamine-analogen aan verschillende DHFR varianten.

Mutanten DHFR →	Wildtype 1j3i	Double mutant 1j3j C59R + S108N	Quadruple mutant 1j3k N51I + C59R + S108N + I164L
Pyrimethamine analogen ↓	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**
Pyrimethamine X = Cl Y = H R = CH_2CH_3	Zie activiteit 10	Zie activiteit 12	
Analoog 1 (AR6) X = H Y = CF_3 R = CH_2CH_3			
Analoog 2 (AR4) X = H Y = F R = CH_2CH_3			

Activiteit 14: In vitro onderzoek

In geneesmiddelonderzoek volgt na lead optimization altijd nog een ***in vitro*** onderzoek. In dit preklinische onderzoek wordt de geoptimaliseerde lead getest op cellen en weefsels die in het laboratorium worden gekweekt. Met *in vitro* onderzoek kan de werking van het antifolaat op geselecteerde cellen goed worden onderzocht. Echter, het eventuele effect op andere cellen en/of bijwerkingen voor het organisme niet. In Fragment 7 staat meer informatie over de preklinische onderzoeksfase.

Het is niet mogelijk om op school een in vitro onderzoek te doen naar de geteste pyrimethamine-analogen in Tabel 1. Daarvoor ontbreken de benodigde instrumenten, materialen, chemicaliën en cellen. Daarom maken we in deze opdracht gebruik van resultaten die door andere onderzoekers zijn verzameld over een aantal pyrimethamine analogen. In Tabel 2 staan de resultaten van enkele kinetiek experimenten met de pyrimethamine-analogen en wild type DHFR, mutanten die ook in Tabel 1 staan én humaan DHFR. De snelheid van de reacties, in aanwezigheid van een pyrimethamine-analoog, is tijdens het proces gevolgd door de absorptie te meten bij 340nm. De resultaten zijn omgerekend naar ***K*i** waarden. Een hoge ***K*i** waarde komt overeen met een hoge DHFR activiteit, en dus een relatief lage (geringe) inhibitie door een antifolaat. In dat geval zal de pyrimethamine analoog dus niet goed werkzaam zijn als antifolaat.

Opdracht: Zoek voor elk geteste pyrimethamine-analoog en DHFR variant (zie Tabel 1) de corresponderende ***K*i** waarde op (zie Tabel 2) en vergelijk deze met de verkregen (theoretische) waarden voor de bindingsenergie (zie resultaten Tabel 1).

a) Blijkt uit de verkregen theoretische waarden voor de bindingsenergie dat de twee mutanten van DHFR méér resistent zijn voor pyrimethamine en de twee geteste analogen dan wildtype DHFR? Wordt dat bevestigd door de waarden van Ki uit tabel 2?

b) Wat kun je in z'n algemeenheid zeggen over het verband tussen de bindingsenergie en de waarde van Ki? Kijk hiervoor ook nog eens terug naar de informatie uit fragment 5.

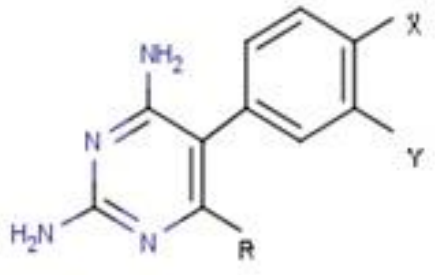
Tabel 2. Inhibitie van verschillende DHFR varianten door pyrimethamine analogen[10]

Inhibition of DHFR activity by *meta*-pyrimethamine analogs of recombinant wild type (**WT**) and mutant DHFR domains of bifunctional DHFR-TS from *P. falciparum* assayed as described in the experimental section.				
Compound	Mutant			
	WT	(C59R + S108N)	(N51I + C59R + S108N + I164L)	hDHFR (*Ki*, nM)
1. Pyrimethamine	1.5 ± 0.2	72 ± 3	859 ± 117	58 ± 3.3
2. Analoog 1 (AR6)	3.9 ± 0.1	3.3 ± 0.5	12 ± 0.7	17 ± 1.2
3. Analoog 2 (AR4)	2.0 ± 0.5	3.6 ± 0.6	28.8 ± 2.6	21 ± 4.0
4. Cycloguanil	2.6 ± 0.3	82 ± 4	730 ± 19	85 ± 14.5

Het ontwerpen van een goede DHFR remmer (= antifolaat) is niet eenvoudig. Een goed antifolaat moet:

1. Goed passen in de bindingsite;
2. Op de juiste plaatsen de juiste bindende krachten tussen de moleculen aangaan:
   - Elektrostatische interacties (zoals waterstof-bruggen);
   - Polaire interacties (zoals dipool-dipool of ion-dipool);
   - Hydrofobe interactie (apolair).
3. Zo sterk mogelijke interactie met mutanten van parasitair DHFR hebben.

We gaan uit van de basisstructuur van pyrimethamine zoals weergeven in Figuur 11. Op posities R, X en Y kunnen er (functionele) groepen toegevoegd, vervangen of verwijderd worden om nieuwe analogen van pyrimethamine te maken.



Figuur 12. Basisstructuur voor lead optimization. Voor Pyrimethamine geldt: R = CH_2CH_3; X = Cl; Y = H

Activiteit 15: Bioisosterism als strategie voor lead optimization van pyrimethamine

Opdracht: Ontwerp ten minste één analoog dat zowel wildtype DHFR als de 2 mutanten in voldoende mate remt en beargumenteer je ontwerp. Als strategie voor het ontwerpen van een goed analoog gebruiken we 'Bioisosterism'. Lees hiervoor de achtergrond informatie over Bioisosterism in fragment 6 goed door. Ook krijg je van je docent werkbladen uitgereikt waarin de bindingssites van de verschillende varianten van DHFR in 2D weergegeven zijn. Bepaal van je eigen ontwerp ook de bindingsenergie met de DHFR varianten m.b.v. Arguslab. Verzamel de resultaten in Tabel 3.

Tabel 3. Relatieve bindingsenergieën van zelf ontworpen analoog aan verschillende DHFR varianten

a) Beargumenteer waarom je je eigen ontworpen analoog zo hebt gemaakt. Dus leg uit waarom je bepaalde functionele groepen hebt toegevoegd of verwijderd en wat je

[10] Bron: Alireza Sardarian, Keneth T. Douglas, Martin Read, Paul F.G. Sims, John E. Hyde, Penchit Chitnumsub, Rachada Sirawaraporn and Worachart Sirawaraporn. (2003). Pyrimethamine analogs as strong inhibitors of double and quadruple mutants of dihydrofolate reductase in human malaria parasites. Aangepast voor relevante informative.

argumentatie daarvoor is. Maak hiervoor gebruik van de uitgereikte werkbladen waarin de bindingssites van de verschillende varianten van DHFR in 2D zijn weergegeven.

Mutanten DHFR	Wildtype 1j3i	Double mutant 1j3j C59R + S108N	Quadruple mutant 1j3k N51I + C59R + S108N + I164L
Pyrimethamine analogen	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**
Eigen ontwerp X = …….. Y = …….. R = ……..			

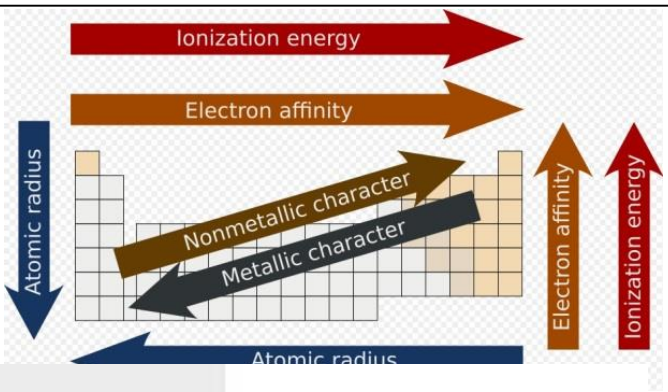
Fragment 6: Achtergrond informatie over Bioisosterism

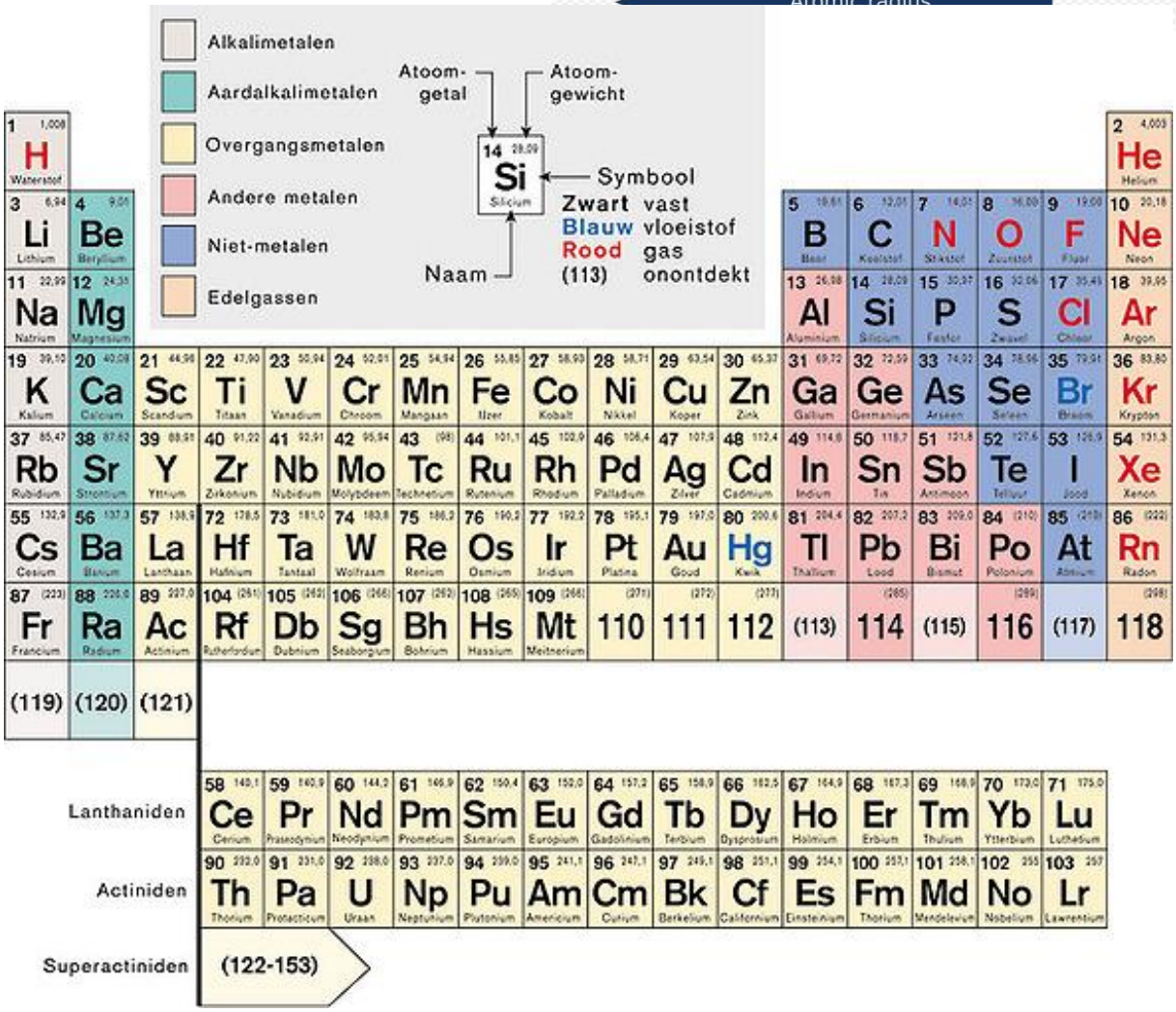
Bioisosterism[1] is een strategie die wordt gebruikt voor het gericht ontwerpen van medicijnen. Bij deze strategie worden atomen of groepen atomen van de lead verplaatst en/of vervangen, zodanig dat de lead beter bindt aan het target en dus de werking van het target remt.
Voorwaarde voor toepassing van deze strategie is dat de 3D structuur van zowel de lead als het target bekend is en dat de interacties en mechanismen die leiden tot binding, enzymactiviteit en inhibitie daarvan bekend zijn.
Het idee achter bioisosterism is dat de lead beargumenteerd wordt gemodificeerd (**bioisosteric modificatie**), d.w.z. het toevoegen, verplaatsen of verwijderen van (functionele) groepen. Bioisosteric modificatie van de lead gebeurt op basis van een zorgvuldige analyse van onderstaande aspecten *in onderlinge samenhang*:

1. De sterische hindering (afmetingen / grootte);
2. De elektronenconfiguratie, **inductieve** en **mesomere** effecten;
3. De hydrofiel en hydrofoob;
4. De vorming van inter- en intramoleculaire waterstofbruggen;
5. De chemische reactiviteit en stabiliteit;
6. De oplosbaarheid in **lipide** en waterige omgevingen;
7. De **pK_a**.

In het kader van deze module maken we gebruik van aspecten 1 t/m 4, die hieronder worden toegelicht. Daarna volgen enkele toepassingen van de bioisosterism strategie.
Aspecten 1 en 2: sterische hindering en elektronenconfiguratie, inductieve en mesomere effecten
Atomen en groepen van atomen verschillen van elkaar van grootte en elektronenconfiguratie. De grootte van ieder atoom (of groep van atomen) bepaalt de mate van sterische hindering. De grootte en elektronenconfiguratie van een atoom bepalen samen de elektronegativiteit van een atoom.
Het **periodiek systeem der elementen** is een tabel met daarin de chemische elementen, geordend volgens hun atoomnummers (aantal protonen in de atoomkern), zodanig dat elementen met vergelijkbare elektronenconfiguratie (en daarmee vergelijkbare stofeigenschappen) boven elkaar staan. In het periodiek systeem zijn een aantal periodieke trends zichtbaar, waaronder:
fragment loopt door op de volgende bladzijdes)

- De grootte van de atomen neemt toe gaande van rechtsboven naar linksonder;
- De elektronegativiteit van de atomen neemt toe gaande van linksonder naar rechtsboven.





Inductieve en mesomere effecten bepalen de ladingsverdeling in een molecuul. De ladingsverdeling is bepalend voor de reactiviteit van een molecuul en geeft inzicht in het gedrag van een molecuul.

Het inductief effect is aanwezig zodra er sprake is van een binding tussen twee atomen met verschillende elektronegativiteiten. Het bindingselektronenpaar zal sterker gelokaliseerd zijn bij het meest elektronegatieve atoom. Als gevolg daarvan krijgt dit atoom een partiële negatieve lading en het minder elektronegatieve atoom een partiële positieve lading. Als een molecuul polair is, is een deel van het molecuul positiever geladen dan het andere deel van het molecuul. Dus het inductief effect is een fenomeen waarbij een ladingsverdeling in een molecuul ontstaat door polarisaties in covalente bindingen als gevolg van verschillen in elektronegativiteit tussen atomen die betrokken zijn in de covalente binding.

Het mesomeer effect is ook een fenomeen waarbij een ladingsverdeling in een molecuul ontstaat, echter nu veroorzaakt door (vooral) delokalisatie van elektronen in het "pi-systeem" van een molecuul. Een “pi-systeem” treedt op bij dubbele bindingen al of niet alternerend met enkelvoudige bindingen. Een bekend molecuul waarin sprake is van een “pi-systeem” is benzeen. De elektronen in een “pi-systeem” zijn geconjugeerd en interageren met elkaar. Dat wordt het mesomeer effect genoemd.

Aspecten 3 en 4: De hydrofiel en hydrofoob, vorming van intra- en intermoleculaire waterstofbruggen

De term hydrofiel beschrijft iets dat 'van water houdt'. Hydrofiele stoffen lossen goed op in water. Een van de redenen waarom ze dit kunnen, is omdat ze waterstofbruggen kunnen vormen. Stoffen die waterstofbruggen kunnen vormen, zijn dan ook per definitie hydrofiel. Waterstofbruggen kunnen in potentie gevormd worden als het molecuul functionele groepen als hydroxyl (– OH), amine (– NH_2) en/of waterstofsulfide (– SH) bevat. Waterstofbruggen kunnen zowel in een molecuul (intra) als tussen moleculen (inter) gevormd worden. Een hydrofiel (deel van een) molecuul is typisch elektrisch gepolariseerd en in staat tot het aangaan van waterstofbruggen.

Naast hydrofiele stoffen onderscheiden we hydrofobe stoffen. Een hydrofobe stof heeft ‘watervrees’ en zal dus niet of nauwelijks oplossen in water. Voorbeelden van hydrofobe stoffen zijn vetten en oliën. Een hydrofobe stof is niet elektrisch gepolariseerd, het molecuul heeft geen ladingsverdeling (geen positieve dan wel negatieve kant).

Enkele toepassingen (redenaties) van de bioisosterism strategie

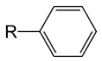
- Vervanging van een waterstof (H) atoom door een fluor (F) atoom. Overwegingen hierbij zijn:
  - Een fluor atoom is praktisch even groot als het waterstof atoom.
  - Het fluor atoom is het meest elektronegatieve halogeen.
  - De C – F binding zeer stabiel.

Dit maakt fluor uitermate geschikt om het effect van elektronegativiteit te bestuderen zonder de grootte te beïnvloeden (en daarmee eventuele sterische hindering). Wanneer de sterische hindering geen factor is waarmee rekening gehouden hoeft te worden, dan zijn ook andere halogenen potentiële kandidaten voor vervanging van een waterstof atoom. Een methyl groep (– CH_3) wordt vaak vervangen door een trifluoridemethyl groep (– CF_3), die een sterk elektron-zuigende werking heeft.

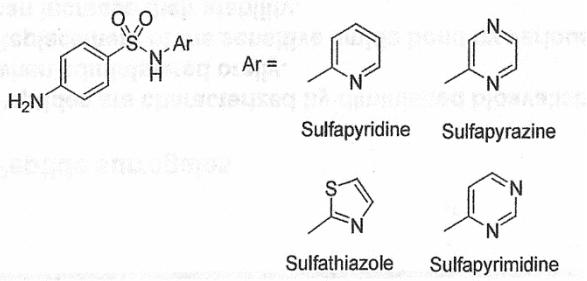
- Vervanging van een hydroxyl groep (– OH) door amine (– NH_2) of waterstofsulfide (– SH). Overwegingen hierbij zijn:
  - Zuurstof (O) en monoamine (NH) hebben een vergelijkbare omvang. Het waterstofsulfide (– SH) is echter veel groter!
  - Alle drie groepen atomen kunnen waterstofbruggen vormen.

Dezelfde overwegingen gaan ook op voor vervanging van een aldehyde (– C=O) door de groepen – C=NH of – C=S.

- Ter vervanging van halogenen kunnen de cyanide groep (– C≡N) of de trifluoridemethyl groep (– CF_3) worden ingezet. Beide groepen hebben sterk elektronen-zuigende eigenschappen. De cyanide groep
  (– C≡N) en de trifluoridemethyl groep (– CF_3) hebben vergelijkbare effecten op de elektronegativiteit, maar de cyanide groep (– C≡N) heeft een hydrofoob karakter.
- Een fenyl groep, een relatief inerte (lage chemische reactiviteit) groep, heeft een hydrofoob karakter. Een fenylgroep kan wel mesomere effecten teweeg brengen. Een fenyl groep kan worden vervangen door heterogeen samengestelde, cyclische aromaten om de reactiviteit van de lead te verhogen. Zie onderstaande voorbeeld.

Fenyl: 

Onderstaand een afbeelding waarbij op positie 'Ar' vier ring equivalenten van fenyl zijn geplaatst, respectievelijk sulfapyridine, sulfepyrazine, sulfathiazole en sulfapyrimidine.



Additionele achtergrondinformatie over isosterism en bioisosterism

Isosteren zijn (groepen van) atomen en moleculen die overeenkomstige chemische en fysische eigenschappen hebben. Enkele uitgangspunten bij isosterism:

- Atomen of groepen atomen die *hetzelfde aantal atomen en elektronen* hebben kunnen als vervangers van elkaar dienen (Langmuir, 1919). Voorbeelden:
  N_2 en CO; N_2O en CO_2; N_3^- en NCO^-
- Door toevoeging van een **hydride** (waterstof) aan een zeker atoom heeft het resulterende construct (pseudoatoom) dezelfde eigenschappen als het eerstvolgende atoom in het periodiek systeem (Grimm, 1925). Voorbeelden:

Hydride verplaatsingsregel					
– C –	– N –	– O –	– F	Ne	Na^+
	– CH	– NH –	– OH	– FH	-
		$– CH_2 –$	$– NH_2$	H_2O	$– FH_2^+$
			$– CH_3$	NH_3	$– OH_3^+$
				CH_4	$–NH_4^+$

- Atomen, ionen of moleculen die hetzelfde aantal elektronen bezitten in de buitenste schillen kunnen als gelijkwaardig worden beschouwd (Erlenmeyer, 1932). Voorbeelden:
  - Atomen die in dezelfde kolom van het periodiek systeem zitten, zoals C, Si en Ge (groep IV in het periodiek systeem) of F, Cl, Br en I (groep VII in het periodiek systeem).

Bioisosteren zijn (groepen van) atomen of moleculen die voldoen aan de definities van isosteren, overeenkomstige chemische en fysische eigenschappen hebben én vergelijkbare biologisch effecten hebben (Friedman, 1951; Thornber, 1979).

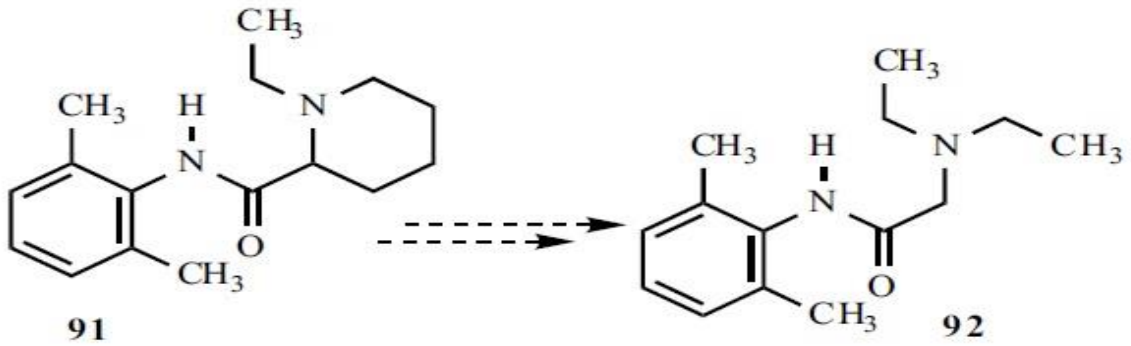
Ruwweg zijn er twee aanpakken voor bioisosterism te onderscheiden, namelijk een *klassieke* en *niet-klassieke* aanpak. De klassieke aanpak neemt het aantal valentie elektronen van een atoom of groep atomen als uitgangspunt, waarbij onderscheid wordt gemaakt tussen mono-, di-, tri- en tetravalente atomen of groepen. Tevens worden equivalente ringstructuren bestudeerd. In onderstaande Tabel 1 zijn enkele mogelijke vervangingen van mono-, di-, tri en tetravalente atomen en groepen weergegeven.
Tabel 1. Klassieke bioisostere atomen en groepen

Monovalent	Divalent	Trivalent	tetravalent
– OH , – NH_2 , – CH_3 , – OR	– CH_2 –	= CH –	= C =
– F , – Cl , – Br , – I , – SH, – PH_2	– O –	= N –	= Si =
– Si_3 , – SR	– S –	= P –	= N^+ =
	– Se –	= As –	= P^+ =
	– Te –	= Sb –	= As^+ =
			= Sb^+ =

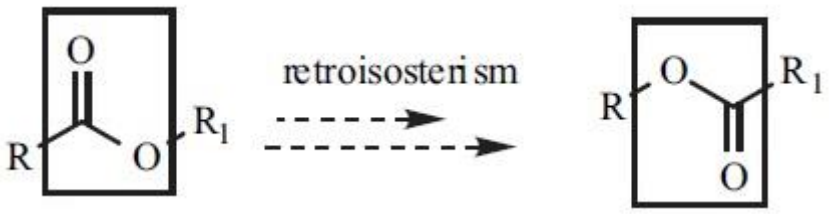
R = restgroep

De niet-klassieke route focust op functionele groepen, effecten van cyclische vs. niet-cyclische molecuulstructuren en retroisosterism. Voor de beeldvorming volgt hieronder van iedere categorie een kort voorbeeld.

- Een bekend voorbeeld van een functionele groep is de carboxylgroep (- COOH), een zure groep met lage (pK_a). Een carboxylgroep kan worden vervangen door een andere zuurgroep zonder de pK_a van het molecuul te veranderen, waarbij wel veranderingen optreden in bijv. de grootte van het molecuul.
- Moleculen met een verschillende 3D-conformatie (cyclische vs. niet-cyclische) kunnen toch dezelfde biologische activiteit en/of functionaliteit hebben.



- Retrobioisosterism is gebaseerd op de spiegeling van een functionele groep in de lead, resulterend in een isostere met dezelfde functionaliteit.



Hoofdstuk 6. Op weg naar een geneesmiddel

In de voorgaande hoofdstukken heb je het proces van lead optimization ('docking en scoring') doorlopen. In deze module hebben we de molecular modeling techniek gebruikt om een potentieel nieuw leadmolecuul te ontwerpen. In de praktijk worden meerdere technieken toegepast om een potentiële lead te vinden of ontwerpen, maar de pyrimethamine-analoog die je in activiteit 15 ontworpen en theoretisch getest hebt, is wellicht een potentieel geschikt molecuul om in een geneesmiddel te worden verwerkt. Maar nadat een potentiele lead is gevonden, moeten er nog diverse fasen worden doorlopen totdat het als geneesmiddel op de markt geïntroduceerd kan worden. In Fragment 7 staat dit proces in hoofdlijnen beschreven.

Activiteit 16: Van Drug Discovery naar Marktintroductie

In deze opdracht kijken we terug naar het proces van lead optimization dat je doorlopen hebt in deze module. Tegelijkertijd kijken we vooruit naar wat er allemaal nog meer komt kijken bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen.

a) Lees Fragment 7 en maak een blokschema waarbij het hele proces van de zoektocht naar een potentieel medicijn tot de marktintroductie wordt weergegeven. Zoek uit hoeveel tijd (gemiddeld, ruwe schatting) iedere fase kost. Waar in dit proces bevindt zich de lead finding en de lead optimization fase?

b) Wat kun je nu op basis van je eigen ervaringen als voor- en nadelen noemen over het proces van lead-optimization? Vind je lead optimization een geschikte methode om nieuwe medicijnen te ontwikkelen voor malaria?

c) Kun je iets zeggen over de voorspellende waarde van Ki en de binding van lead en target voor het vinden van een goed geneesmiddel? Kijk hiervoor nog eens terug naar je conclusies van activiteit 14 en 15.

d) Als eindniveau van deze module moet je onder andere 'a.d.h.v. de malaria context kunnen toelichten hoe Molecular Modeling bijdraagt aan de ontwikkeling van medicijnen'. Leg dit in minimaal 150 woorden uit.

Fragment 7. Fasen in het proces van geneesmiddelontwikkeling.

Preklinisch onderzoek

De geoptimaliseerde lead wordt eerst getest op cellen en weefsels die in het laboratorium worden gekweekt. Dit heet ***in vitro*** onderzoek. Met *in vitro* onderzoek kan de werking van het middel op geselecteerde cellen goed worden onderzocht. Echter, het eventuele effect op andere cellen en/of bijwerkingen voor het organisme niet. Daarom volgt een ***in vivo*** onderzoek in dieren. Door dieren te behandelen met een ziekte die lijkt op de te behandelen ziekte bij mensen verkrijgt men kennis over de effectiviteit van het middel en eventuele bijwerkingen. Het voorspellend vermogen van dit preklinisch onderzoek voor de effecten op de mens is echter beperkt.

Klinisch onderzoek

Het testen van geneesmiddelen in de mens wordt klinisch onderzoek genoemd en bestaat uit vier fasen. In de eerste fase wordt uitgezocht in welke dosis het middel moet worden toegediend om een werkzame concentratie in het bloedplasma te krijgen. Daarnaast wordt nagegaan of een dergelijke dosis goed te verdragen is. In deze fase worden gezonde vrijwilligers gevraagd deel te nemen.

In de tweede fase wordt het middel toegediend aan een kleine groep patiënten die lijden aan de ziekte waarvoor het geneesmiddel is ontwikkeld. Ook hier richt het onderzoek zich op het bepalen van de effectieve dosis en de (beste) wijze van toediening.

In de derde fase wordt het potentiele geneesmiddel onderzocht in grote groepen patiënten. De werkzaamheid wordt dan geanalyseerd met de effectmaat: iets wat goed te meten valt en direct verband houdt met het geneesmiddel. In deze derde fase van mens gebonden onderzoek wordt de werking van het geneesmiddel vaak vergeleken met de werking van een placebo: een nepmiddel dat uiterlijk niet te onderscheiden is van het echte middel. Zowel de patiënt als onderzoeker weten tijdens de uitvoering van het onderzoek niet of een individuele patiënt wordt behandeld met de placebo of met het echte geneesmiddel. Door middel van loting wordt bepaald welke patiënt een placebo krijgt en wie het echte middel. Hiermee wordt bereikt dat beide groepen vergelijkbaar zijn voor wat betreft factoren die bij patiënten het effect van de behandeling zouden kunnen beïnvloeden (leeftijd, geslacht, bloeddruk, leefgewoonten, enz.). Dit wordt aangeduid met *dubbelblind gerandomiseerd klinisch onderzoek*. In deze fase wordt definitief bepaald of het ontworpen geneesmiddel effectief is in de behandeling van de ziekte.

Als de resultaten positief zijn, dan start een procedure om het geneesmiddel op de markt te brengen. In deze vierde fase beslist eerst de overheid of de fabrikant het middel op de markt mag brengen. Een fabrikant vraagt een vergunning aan en als deze wordt verleend heet het een *geregistreerd geneesmiddel*. Vervolgens beoordelen ziektekostenverzekeraars of het effect significant is om het gebruik te vergoeden. De effecten van het geneesmiddel, maar ook de eventuele bijwerkingen, worden nog jaren na de marktintroductie bijgehouden. Sommige bijwerkingen treden namelijk pas jaren na toediening op. Dit wordt wel *post-marketing surveillance* genoemd. In Nederland wordt dit uitgevoerd door het bijwerkingencentrum Lareb (= Landelijk registratie bijwerkingen; http://www.lareb.nl/) en in Europa door het Europees bureau voor de geneesmiddelenbeoordeling EMEA.

Hoofdstuk 7. Extra opdrachten

In dit hoofdstuk staan een aantal extra activiteiten die je na afronding van de module kunt doen. Je docent zal je vertellen of je deze activiteiten moet doen of niet.

EXTRA OPDRACHT
Activiteit 17: Docken van pyrimethamine aan humaan DHFR 3s7a.
Lees de opdracht in Fragment 4 nog eens. In activiteit 5 heb je ontdekt dat DHFR dihydrofolaat omzet tot een belangrijke bouwsteen van DNA. Pyrimethamine inhibeert deze werking waardoor de parasiet z'n DNA niet meer goed kan bouwen en uiteindelijk sterft. Wanneer pyrimethamine (of een analoog van pyrimethamine) toegepast wordt in medicijnen tegen malaria, dient het analoge humane DHFR ongemoeid te blijven. De lead (pyrimethamine) moet dus wel heel specifiek alleen het parasitaire doeleiwit (DHFR) blokkeren.

a) Bedenk en verklaar waarom een antifolaat toegepast in medicijnen tegen malaria minder (geen) interactie aan mag gaan met humaan DHFR (PDB code 3s7a)?

b) Bereken de bindingsenergie van pyrimethamine en de andere analogen (inclusief je eigen ontwerp) die je in activiteit 13 en 15 getest hebt nu aan humaan DHFR 3s7a in ArgusLab. Vergelijk je resultaten met de verkregen bindingsenergieën aan parasitair DHFR (zowel wildtype als de verschillende mutanten). Wat is je conclusie?

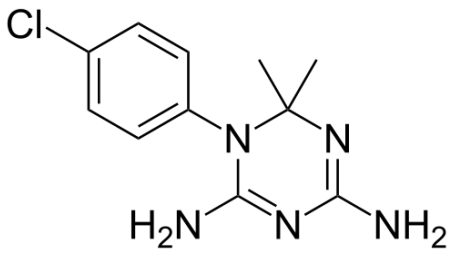
Naast het feit dat pyrimethamine humaan DHFR zoveel mogelijk ongemoeid moet laten, is het van belang dat in aanwezigheid van pyrimethamine, dihydrofolaat (de stof waar DHFR normaal gesproken interactie mee aangaat) nog wel interactie aangaat met het humane DHFR. Op die manier worden de menselijke processen in het lichaam niet verstoord tijdens de bestrijding van de malaria parasiet.

c) Bedenk een manier hoe je dit zou kunnen testen en licht dit toe.

EXTRA OPDRACHT
Activiteit 18: Docken van cycloguanil
Kijk nog eens terug naar Figuur 3 op bladzijde 10. Hier worden twee methoden beschreven.

a) Welke methode heb je in activiteit 15 o.a. toegepast?
b) Wat is het verschil tussen de door jou toegepaste methode en de overgebleven methode? Leg uit.

Om ook de andere methode toe te passen wordt er nog een ander antifolaat getest, proguanil. In activiteit 2 heb je al kennis gemaakt met deze stof. Het lead target van proguanil is net als dat van pyrimethamine, DHFR. In het lichaam wordt proguanil omgezet naar een **actieve metaboliet**, cycloguanil (Figuur 13). Cycloguanil bindt op dezelfde plaats binden als pyrimethamine. De aminozuur residuen in de bindingsite voor



Figuur 13: structuurformule

cycloguanil zijn dus: Ile-14, Cys-15, Asp-54, Phe-58 en Pro-113, Ile-164.

c) Onderzoek en beredeneer of cycloguanil een betere werking als inhibitor heeft dan pyrimethamine (en analogen) bij wild type DHFR. Gebruik hiervoor de kennis die je tijdens deze module opgedaan hebt. Wat is je conclusie?

EXTRA OPDRACHT

Activiteit 19: Geneesmiddelen voor malaria in de EU

Om deze module af te sluiten doe je een kort onderzoek naar een relatief nieuw malariamedicijn. Dit ga je doen door onderstaande vragen te beantwoorden.

Opdracht:

a) Zoek op de website van EMEA http://www.ema.europa.eu/ema/ het geautoriseerde geneesmiddel voor malaria in Europa op. De naam van dit geneesmiddel is Eurartesim.
b) Welke werkzame stoffen bevat dit geneesmiddel?
c) Op welke manier grijpen de werkzame stoffen in op de malaria parasiet?
d) Het geneesmiddel staat momenteel onder 'Additional monitoring'. Waar richt deze additional monitoring zich op?

Bijlage 1 – Woordenlijst

- **Active site:** Het gedeelte van een enzym waarin de werking plaatsvindt. Meestal ook de plek waar een werkzame stof bindt (maar niet altijd).
- **Binding site:** De plek waar de werkzame stof aan het enzym bindt.
- **Actieve metaboliet:** Een actieve vorm van een medicijn nadat het lichaam het heeft verwerkt.
- **Analoog:** Eiwitten zijn analogen van elkaar wanneer ze dezelfde functie hebben maar niet dezelfde eiwitstructuur hebben.
- **Antifolaat:** Een stof die de werking van het enzym DHFR blokkeert door een interactie met dit enzym aan te gaan.
- **Atoombinding**: Zie covalente binding.
- **Bindingsenergie**: De energie die nodig is om een binding te vormen of breken. Het vormen van bindingen kost energie, hier is daarom sprake van een negatieve bindingsenergie waarde.
- **Bioisosterism:** Strategie om medicijnen te ontwerpen waarbij atomen of groepen atomen van een lead gericht worden verplaatst en/of vervangen. Deze gerichte modificatie vindt plaats op basis van verschillende aspecten, zoals sterische hindering, elektronenconfiguratie, hydrofobiciteit, pKa en nog meer aspecten, om zo de lead beter te laten binden aan het target.
- **Competitieve inhibitie:** Inhibitor remt het enzym door op dezelfde plaats aan het enzym te binden als het substraat. Het substraat en de inhibitor moeten dus competitie met elkaar aangaan om de bindingsplek.
- **Covalente binding**: Er is sprake van een covalente binding (ook wel atoombinding genoemd), wanneer twee atomen een gemeenschappelijk elektronenpaar delen en zo een binding met elkaar aangaan. Deze binding kan zowel apolair als polair zijn.
- **DHFR mutant**: Als er een mutatie optreedt in het gen dat codeert voor het DHFR eiwit, kan het zo zijn dat er op een bepaalde plek in het eiwit één of meerdere verkeerde aminozuren ingebouwd worden. Op die manier verandert ook de 3D structuur van het eiwit. Een DHFR mutant is dus een DHFR eiwit waar zo'n mutatie heeft plaatsgevonden, waardoor de 3D structuur is veranderd.
- **Doeleiwit**: Het eiwit waar het (te ontwikkelen) medicijn op aangrijpt. Bij infectieziekten is dit doeleiwit vaak een essentieel eiwit van de ziekteverwekker. Dit doeleiwit moet gehinderd of geblokkeerd worden door het medicijn, waardoor de ziekteverwekker zal sterven.
- **Enzym:** Een eiwit dat zorgt, dat een reactie van zijn substraat wordt versneld of kan plaatsvinden, zonder zelf opgebruikt te worden. Een enzym is een biologische katalysator.
- **Enzym-substraat complex:** complex dat ontstaat wanneer het substraat in de active site van het enzym gebonden is.
- **Essentieel eiwit:** Een eiwit wat niet gemist kan worden door een cel of lichaam om te overleven.
- **Functionele groepen**: Onderdelen van een molecuul met een specifieke en karakteristieke eigenschap. Deze onderdelen hebben een functie in het molecuul. De functionele groep is vaak betrokken bij een reactie van een molecuul.
- **Humaan DHFR**: Het DHFR eiwit dat in de mens voorkomt. Dit eiwit is een analoog van het parasitaire DHFR.
- **Hydride:** Een waterstofatoom dat aan een ander atoom kan binden.
- **Inductief effect:** Een fenomeen waarbij een ladingsverdeling in een molecuul ontstaat door polarisaties in covalente bindingen als gevolg van verschillen in elektronegativiteit tussen atomen die betrokken zijn in de covalente binding.
- **In vitro:** Een term die wordt gebruikt wanneer experimenten worden gedaan met cellen of weefsels die in het laboratorium worden gekweekt. De experimenten vinden

dus buiten het lichaam van het organisme plaats, in tegenstelling tot *in vivo* experimenten.

- **In vivo:** Een term die wordt gebruikt wanneer experimenten worden gedaan met complete levende organismen.
- **Inhibitor:** een stof die de werking van een enzym remt door aan het enzym te binden.
- **Interactie:** Het 'koppelen' van twee moleculen. Dit gebeurt door middel van waterstofbruggen, vanderwaalsbindingen, dipool-dipool interacties en dergelijke. De moleculen *reageren* dus niet, want er worden geen covalente bindingen (atoombindingen) gevormd. Het komt wel voor dat deze interactie ervoor zorgt dat een van de moleculen van vorm verandert, bijvoorbeeld bij de interactie tussen een enzym en een substraat.
- **Ki waarde:** De waarde die overeenkomt met de concentratie van de inhibitor waarbij de helft van de enzymen gebonden zijn aan de inhibitor en de helft van de enzymen ongebonden zijn.
- **Lead:** Een molecuul dat een interactie aangaat met een target. Door een lead aan te passen kunnen medicijnen ontwikkeld worden.
- **Lipide:** Een vet of vetachtige stof die niet oplosbaar is in water.
- **Malaria**: Een ernstige ziekte die verspreid wordt door malariamuggen en veroorzaakt wordt door eencellige parasieten. Er sterven jaarlijks veel mensen aan malaria.
- **Malariamug:** Een mug die de malariaparasiet in zijn speeksel heeft. Als een malariamug een mens steekt, komt de parasiet in het menselijk bloed terecht.
- **Medicijn:** Een stof of een mengsel dat gebruikt wordt om een ziekte te bestrijden. Elk medicijn bevat tenminste één werkzame stof. Wanneer een medicijn in de fabriek wordt geproduceerd noemen we het een synthetisch middel, een synthetisch middel is niet rechtstreeks uit de natuur te halen.
- **Mesomeer effect:** Een fenomeen waarbij een ladingsverdeling in een molecuul ontstaat door polarisaties in het molecuul, veroorzaakt door delokalisatie in het "pi-systeem" aanwezig in een molecuul.
- **Metabolisme:** Reacties in het lichaam waarbij een stoffen wordt omgezet in een andere stoffen.
- **Molecular Modeling**: Een techniek om met behulp van de driedimensionale structuur van moleculen het gedrag van moleculen te kunnen voorspellen of verklaren. Vaak worden hierbij computer programma's gebruikt om ingewikkelde berekeningen uit te voeren.
- **(Malaria)parasiet:** Een parasiet is een organisme dat leeft ten koste van een ander organisme. De malariaparasiet, ook wel *Plasmodium* genoemd, is een eencellige eukaryoot (dus geen bacterie of virus) die zich ophoopt in rode bloedcellen en deze van binnenuit doodt.
- **(Malaria)profylaxe:** Een profylaxe is een stof waar een ziekte mee *voorkomen* kan worden. Een malariaprofylaxe is dus een stof of medicijn waarmee malaria voorkomen kan worden.
- **Niet- competitieve inhibitie:** Inhibitor remt het enzym door op een andere plek aan het enzym te binden dan het substraat. Ook al kan het substraat zo wel aan het enzym binden en gaan de substraat en de inhibitor geen competitie met elkaar aan, zal toch de werking van het enzym geremd worden. Dit gebeurt bijvoorbeeld doordat de binding van de inhibitor ervoor zorgt dat de 3D structuur van het enzym verandert.
- **Peptidebinding**: Chemische binding tussen de zuurgroep van het ene aminozuur en de aminogroep van een ander aminozuur. Hierbij verbinden twee aminozuren zich met elkaar, waarbij een peptide ontstaat. Bij de vorming van een peptidebinding komt water vrij.

- **Periodiek systeem der elementen:** Een tabel met daarin de chemische elementen, geordend volgens hun atoomnummers (aantal protonen in de atoomkern), zodanig dat elementen met vergelijkbare elektronenconfiguratie (en daarmee vergelijkbare stofeigenschappen) boven elkaar staan.
- **pKa:** De negatieve waarde van de logaritme van de zuurconstante (dus -log Ka, waarbij de Engelse Ka hetzelfde is als de Nederlandse Kz (vergelijk 'acid' met 'zuur')). Hoe kleiner de pKa, des te sterker is het zuur.
- **Resistentie:** Weerstand van de parasiet tegen een medicijn. Wordt veroorzaakt door een aanpassing van de target waardoor de werkzame stof wordt tegengehouden. Zo'n aanpassing is erfelijk, waardoor de resistentie verspreid wordt als de resistente parasiet zich kan vermenigvuldigen.
- **Sterische hindering:** Het effect dat optreedt wanneer er te weinig ruimte voor bepaalde atomen is en de atomen elkaar in de weg zitten.
- **Substraat:** Een stof die een interactie aangaat met een enzym, waarbij het enzym een bepaalde chemische reactie van het substraat katalyseert.
- **Synthetisch middel**: zie medicijn.
- **Target:** Een molecuul dat essentieel is voor een ziekteverwekker om te leven, en waar (mogelijk) een werkzame stof aan kan binden.
- **Werkzame stof**: Een chemische verbinding die zorgt voor de werking van een medicijn. De werkzame stof gaat een interactie aan met een target, het doeleiwit.
- **Wildtype**: De meest voorkomende vorm van een eiwit in de natuur. Dit in tegentelling tot een mutant, waarbij mutaties zijn opgetreden in het DNA en daardoor de structuur van het eiwit is veranderd.

Appendix B. Planning

Week	In class	Assignments / Homework
1	• **Introduction PA**: Class about Malaria (Bio) • **Explanation**: Proteins and protein structure (Chem) • **Chapter 1**: Malaria: a severe disease.	**Activity 1** **Activity 2** **Activity 3**
2	• **Chapter 2:** The development of new drugs.	**Activity 4** **Activity 5** **Activity 6**
3	• **Explanation**: Protein synthesis (Bio) • **Explanation:** binding energy and binding interactions (Chem) • **Chapter 3:** Examination of lead target DHFR. • **Chapter 4:** Examination of lead Pyrimethamine. • *Hand in activity 1 - 6*	**Activity 7** **Activity 8** **Activity 9** **Activity 10** **Activity 11**
4	• **Chapter 5:** Test and develop Pyrimethamine-analogs as inhibitor of DHFR. • **Chapter 6:** Towards a new drug. • *Hand in activity 7 - 11*	**Activity 12** **Activity 13** **Activity 14** **Activity 15** **Activity 16**
5	• *Hand in activity 12 - 16* • Presentations	

Appendix C. Interview protocols
First interview protocol curriculum unit 'drug development against Malaria'

This semi-structured interview will be conducted after completion of activity 6 of the curriculum unit. Students will be interviewed in their group (so two or three at the same time, depending on the size of the group they are working in). The interview will take about 10-15 minutes.

It is important that the students have their answers of activity 1-6 with them (digital or on paper), so they can look back or refer to the activities. Also the results of the first questionnaire should be hold at hand.

The interview will be recorded **(ask for permission)**. The interview will anonymously be analyzed. After this interview, two more interviews will follow (one half way the curriculum unit and one after completion of the curriculum unit).

The interviews are also based on the answers of the previous activities. These will be analyzed in between.

Questions:

- What do you think of the curriculum unit so far?
    - Why do you think so?

- Describe what you mean by 'lead optimization'.
    - What function does lead optimization have in drug development?
    - Why would we get started with lead optimization?

- In activity 6 you have created a roadmap for the assignment: lead optimization of pyrimethamine.
    - Can you explain your roadmap?
    - Have you considered any other steps?
    - Are steps lacking your roadmap which you did consider to put in?
    - Would you want to change anything in your roadmap?
    - Can you argue why you want to take these steps in this order?

- What is the most important thing you have learned so far?

- Is there anything you would like to say about the curriculum unit?

Appendix C. (Continued)
Second interview protocol curriculum unit 'drug development against Malaria'

This semi-structured interview will be conducted after completion of activity 11 of the curriculum unit. Students will be interviewed in their group (so two or three at the same time, depending on the size of the group they are working in). The interview will take about 10-15 minutes.

It is important that the students have their answers of activity 7-11 with them (digital or on paper), so they can look back or refer to the activities.

The interview will be recorded **(ask for permission)**. The interview will anonymously be analyzed. After this interview, one more interview will follow after completion of the curriculum unit.

Questions

- I am curious about your experiences so far! We have been working on lead optimization for a couple of weeks now. Can you mention a couple of positive and negative aspects of the curriculum unit?
    - For example: which activity did you enjoy? Can you show me?
    - What did stand out positively?
        - Why is that? What is behind it?
    - What did stand out negatively?
        - Why is that? What is behind it?

- Explain in your own words why lead optimization is being used for drug development by scientists.

- Lead optimization involves the adjustment of molecules. This is also being called 'Molecular Modeling'. Can you describe in your own words which aspects play a role in Molecular Modeling? What are you going to look for?

- (Worksheet of activity 8) Why did you draw pyrimethamine and the interactions like this? Which considerations did you have?
    - What do you see?
    - What do you expect?
    - Can you explain what you see here / what you have drawn here?

- Is there anything you would like to say about the curriculum unit?

Appendix C. (Continued)
Third interview protocol curriculum unit 'drug development against Malaria'

This semi-structured interview will be conducted after completion of the curriculum unit. Students will be interviewed in their group (so two or three at the same time, depending on the size of the group they are working in). The interview will take about 10-15 minutes.

It is important that the students have their answers of the curriculum unit with them (digital or on paper), so they can look back or refer to the activities.

The interview will be recorded **(ask for permission)**. The interview will anonymously be analyzed.

Some additional questions might be asked, based on the presentations of the students about their developed analog. This involves individual questions which are being used to clarify some statements which were said during the presentations.
Questions

- I am curious about your experiences so far! We have been working on the curriculum unit for a couple of weeks. Can you mention a couple of positive and negative aspects of the curriculum unit?
    - For example: which activity did you enjoy? Can you show me?
    - What did stand out positively?
        - Why is that? What is behind it?
    - What did stand out negatively?
        - Why is that? What is behind it?

- Can you draw your developed analog in the worksheet. What have you changed?
    - Can you explain why you have changed it like this?
    - Have you used bioisosterism?
        - If yes, how did you use this? Where did you pay attention to?

- Can you explain how you developed this analog?
    - What were the results of Arguslab? Binding energy?
    - Can you tell me something about how good the analog is?
    - Can you explain this? Why is it better / worse?
        - Mention binding energy / Ki

- What would you mention as pros and cons about the process of lead optimization, based on your own experiences? Do you think that lead optimization is an appropriate method for the development of new drugs against malaria?

Appendix D. Questionnaires
Questionnaire curriculum unit 'drug development against malaria disease'

This questionnaire will be filled in after completion of activity 1-3 of the curriculum unit. **Pay attention:** Both the front and the back of this questionnaire consist questions.

Name: ----------

Class: ----------

Age: ----------

Profile: ----------

What is your average score of Chemistry: ----------

Grade the Chemistry course. How do you appreciate the course?

Scale 1 (low) to 10 (high): ----------

Indicate whether you agree with the statements below. Do this by putting a mark in the right box behind the statement.

	Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
I think that drug development is an interesting subject.					
I would like to learn more about how drug development goes.					
The relevance of drug development appeals to me.					

Appendix D. (Continued)
Answer the open questions below as thoroughly as possible.

- Describe what you have learned about malaria / what you already knew about malaria on the basis of activity 1-3 of the curriculum unit.

- What do you already know about the process of drug development? Describe as thoroughly as possible.

Appendix D. (Continued)
Questionnaire curriculum unit 'drug development against malaria disease'

This questionnaire will be filled in after completion the curriculum unit.
Pay attention: Both the front and the back of this questionnaire consist questions.

Name: ----------

Grade the curriculum unit. How do you appreciate the curriculum unit?

Scale 1 (low) to 10 (high): ----------

Indicate whether you agree with the statements below. Do this by putting a mark in the right box behind the statement.

Compared to regular Chemistry lessons, I think that

	Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
The approach and the method of this curriculum unit are pleasant.					
This curriculum unit is substantially more difficult.					
This curriculum unit is more fun and motivating.					

Indicate whether you agree with the statements below. Do this by putting a mark in the right box behind the statement.

	Strongly disagree	Disagree	Neutral	Agree	Strongly agree
I got a better picture of the process of drug development.					
I have learned a lot about lead optimization.					
I know better now what Molecular Modeling means.					

Appendix D. (Continued)
Answer the open questions below as thoroughly as possible:

- Mention at least 2 aspect you have learned about the process of drug development.

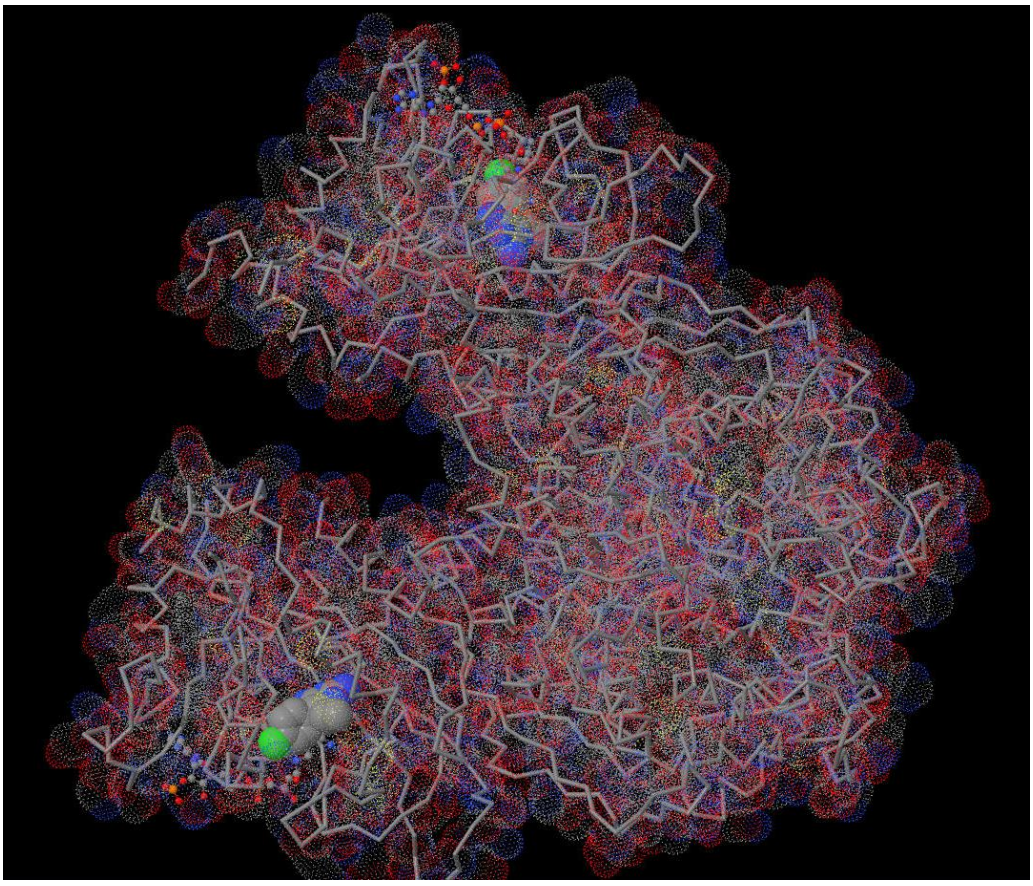
- What have you learned about Molecular Modeling?

- Mention the 2 most important things you have learned from this curriculum unit.

Appendix E. Scenario.

Molecular Modeling
Medicijnontwikkeling tegen Malaria

Scenario



Colofon

Deze lesbrief *Molecular Modeling: Medicijnontwikkeling tegen Malaria* is bestemd voor de lessen scheikunde, bovenbouw VWO.

Deze lesbrief is ontwikkeld in opdracht van het Freudenthal Instituut voor Didactiek van Wiskunde en Natuurwetenschappen, Chemiedidactiek, Universiteit Utrecht door:

- Freudenthal Instituut/Sectie Chemiedidactiek
  - Janske Bode
  - Chrissy van Enckevort
  - Gerret Sanders
  - Gjalt Prins
- Zernike College / Hanzehogeschool Groningen
  - Ton Bominaar

© 2016. Versie 1.6

Voor deze lesbrief geldt een Creative Commons Naamsvermelding-Niet-commercieel-Gelijk delen 3.0 Nederland Licentie

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/nl

Het auteursrecht op deze lesbrief berust bij de Universiteit Utrecht, het Freudenthal Instituut voor Didactiek van Wiskunde en Natuurwetenschappen.

De auteurs hebben bij de ontwikkeling van dit materiaal gebruik gemaakt van materiaal van derden. Waar dat is gebeurd, is zo veel mogelijk de bron vermeld. De lesbrief is met zorg samengesteld. De Universiteit Utrecht aanvaardt geen enkele aansprakelijkheid voor enige schade voortkomend uit (het gebruik van) deze lesbrief.

Aangepaste versies van deze lesbrief mogen alleen verspreid worden, indien in de lesbrief vermeldt wordt dat het een aangepaste versie betreft, onder vermelding van de naam van de auteur(s) van de wijzigingen.

Inhoudsopgave

Colofon 1
Inhoudsopgave 2
Introductie 3
Leerdoelen 3
Hoofdstuk 1. Malaria: een ernstige ziekte 5
Hoofdstuk 2. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen 9
Hoofdstuk 3. Target DHFR onder de loep 13
Hoofdstuk 4. Lead pyrimethamine onder de loep 16
Hoofdstuk 5. Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer 19
Hoofdstuk 6. Op weg naar een geneesmiddel 27
Hoofdstuk 7. Extra opdrachten 29
Bijlage 1 – Woordenlijst 31
Scenario 42
Colofon 43
Inhoudsopgave 44
Leerdoelen 45
Voorbeeld lesplanning 46
Beoordeling 47
Materialen & benodigdheden 47
Prototypische uitwerkingen en functies van de activiteiten 48
Hoofdstuk 1. Malaria: een ernstige ziekte 48
Hoofdstuk 2. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen 51
Hoofdstuk 3. Lead target DHFR onder de loep 54
Hoofdstuk 4. Lead pyrimethamine onder de loep 58
Hoofdstuk 5. Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer 62
Hoofdstuk 6. Op weg naar een geneesmiddel 67
Bijlage 1 – opzet mindmap bij activiteit 4 69
Bijlage 2 – werkblad activiteit 9 70
Bijlage 3 – activiteit 9 71
Bijlage 4 – activiteit 10 72
Bijlage 5 – activiteit 16 73

Leerdoelen

Leerdoelen uit de Scheikunde en Biologie syllabus

Je kunt:

- Een reactiemechanisme opstellen met gebruik van onder andere “molecular modeling”, en daarbij, indien van toepassing, kennis van katalyse gebruiken.
- Kennis van chemische processen in levende organismen beschrijven en gebruiken
- De ruimtelijke structuur van een molecuul of delen daarvan in verband brengen met eigenschappen van een stof of materiaal:
    - secundaire structuur van eiwitten.
- De chemische structuur van eiwitten beschrijven en de bindingen die daarbij horen benoemen:
    - primaire, secundaire, tertiaire en quaternaire structuur.
- Van eiwitten beschrijven welke functie deze stoffen in het lichaam hebben:
    - bouwstof;
    - enzym.
- De termen hydrofoob/hydrofiel in verband brengen met:
    - vanderwaalsbinding, dipool-dipool binding en waterstofbruggen;
    - polair en apolair.
- Bij de werking van een enzym als biokatalysator de kinetiek van de reactie tussen enzym en substraat kwalitatief verklaren en daarbij de volgende begrippen gebruiken:
    - vorming van een enzymsubstraat complex;
    - afsplitsing van een product.
- De specificiteit en selectiviteit van een enzym beschrijven aan de hand van de ruimtelijke structuur en de functionele groepen:
    - actieve plaats.
        - pH-optimum
        - temperatuuroptimum

Leerdoelen specifiek voor de context ‘medicijnontwikkeling tegen Malaria’:

Je kunt:

- Aan de hand van de context malaria uitleggen waarom het belangrijk is nieuwe medicijnen te *blijven* ontwikkelen.
- Uitleggen welke rol **molecular modeling** speelt bij de ontwikkeling van medicijnen en hoe dit proces verloopt.
- De verschillende moleculaire interacties die een rol spelen bij de werking van medicijnen benoemen samen met hun belangrijkste eigenschappen en verklaren hoe deze moleculaire interacties invloed hebben op de werking van een medicijn.

Voorbeeld lesplanning

Week	In de les	Opdrachten ter ondersteuning/huiswerk
1	• **Inleiding PO**: College Malaria (Bio) • **Uitleg**: Eiwitten en eiwitstructuren (Sk) • **H1**: Malaria: een ernstige ziekte	**Activiteit 1** **Activiteit 2** **Activiteit 3**
2	• **H2:** De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen	**Activiteit 4** **Activiteit 5** **Activiteit 6**
3	• **Uitleg**: Eiwitsynthese (Bio) • **Uitleg:** Bindingsenergieën en bindingsinteractie (sk) • **H3:** Target DHFR onder de loep • **H4:** Lead pyrimethamine onder de loep • *Inleveren activiteit 1 t/m 6*	**Activiteit 7** **Activiteit 8** **Activiteit 9** **Activiteit 10** **Activiteit 11**
4	• **H5:** Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer • **H6:** Op weg naar een geneesmiddel • *Inleveren activiteit 7 t/m 11*	**Activiteit 12** **Activiteit 13** **Activiteit 14** **Activiteit 15** **Activiteit 16**
5	• **H7**: Extra opdrachten (optioneel) • *Inleveren activiteit 12 t/m 16*	

Beoordeling

Hieronder worden enkele suggesties gegeven die als eindproduct van deze module voor de leerlingen kunnen dienen. Daarnaast worden ook enkele tips gegeven waar specifiek op gelet kan worden bij deze beoordeling.
Ten eerste kunnen de uitwerkingen van de verschillende activiteiten van deze module beoordeeld worden. Het begin van de module is met name gericht op achtergrond informatie en introductie van het onderwerp, maar na mate de module vordert, worden leerlingen meer uitgedaagd om te kijken naar moleculaire interacties en kijken ze hoe deze invloed hebben op de werking van de inhibitor. Met name activiteiten 6, 8, 9, 10, 13, 14 en 15 laten zien of leerlingen inzicht hebben in het proces van lead optimization.
Naast de uitwerkingen van de activiteiten kunnen leerlingen ook de opdracht krijgen om op het eind een wetenschappelijke poster presentatie te geven over hun eigen ontworpen analoog. Zo kunnen leerlingen aan hun klasgenoten laten zien welk analoog zij ontworpen hebben en waarom ze dit zo gedaan hebben. Op die manier kun je goed inzicht krijgen in het ontwerp proces van de leerlingen en hun argumentatie hierachter. Hierbij zou je de leerlingen na activiteit 3 een oefen presentatie kunnen laten houden over de verschillende medicijnen die er bestaan tegen malaria. Op die manier kunnen ze al feedback (van elkaar of van de docent) krijgen op hun poster en presentatie. Dit kan ze helpen om hun uiteindelijke poster presentatie goed voor te bereiden.

Materialen & benodigdheden

- Lesmateriaal module
- Instructie manual Arguslab
- Laptops / computers waar Arguslab op geïnstalleerd kan worden (er bestaat nog geen versie van Arguslab die geschikt is voor Apple apparaten).
- Werkbladen waar de bindingssite van wildtype DHFR en de bindingssite van 2 mutanten van DHFR op afgebeeld zijn. Er zijn twee verschillende versies; zowel de bindingssites waar pyrimethamine zelf *niet* in weergegeven is (nodig voor activiteit 8 en 9) als de bindingssites waar pyrimethamine zelf *wel* in weergegeven is (nodig voor activiteit 15).
- Evt. posterformaat papier.

Hoofdstuk 1. Malaria: een ernstige ziekte

Activiteit 2: Preventie van malaria

Lees de tekst op pagina 5 over de infectieziekte malaria. Er wordt veel gedaan om de verspreiding van malaria tegen te gaan, zowel voorkomen als genezen.

Opdracht: Maak een overzicht van methoden om het krijgen van de ziekte Malaria te *voorkomen*. Noteer enkele voor- en nadelen van de verschillende methoden die je hebt gevonden.

Gebruik onderstaande website als start voor je informatiezoektocht:

WikiPedia:	http://nl.wikipedia.org/wiki/Malaria
Gezond op reis:	http://www.gezondopreis.nl/Infectieziekten/Malaria.aspx
Tropencentrum AMC:	http://www.tropencentrum.nl/reizigersbureau.asp?dc=213

Didactische tips & suggesties:

Kunnen leerlingen gewoon goed zelfstandig doornemen.

Functie:

Zie activiteit 3

Uitwerkingen activiteit 1:

Om het krijgen van malaria tegen te gaan, zijn er verschillende methoden te gebruiken.

- Medicijnen (malariatabletten)

Voordeel: Het is gemakkelijk en effectief (goede bescherming);
Nadeel: Medicijnen kunnen soms erg vervelende bijwerkingen hebben en de kosten kunnen hoog oplopen.

- Muggen werende middelen, zoals DEET of muskietennetten

Voordeel: Het is goedkoop;
Nadeel: Beschermt niet volledig.

- Bedekken van de huid

Voordeel: Gemakkelijk, goedkoop;
Nadeel: Warm, onpraktisch en beschermt niet volledig.

Activiteit 2: Preventieve medicijnen

Tijdens de uitvoering van activiteit 1 ben je waarschijnlijk ook verschillende medicijnen tegengekomen. Er zijn een beperkt aantal geneesmiddelen om malaria te voorkomen en/of te bestrijden voorhanden. Hieronder worden een aantal medicijnen genoemd die voor **malariaprofylaxe** gebruikt worden. Welke van deze medicijnen voorgeschreven worden, hangt af van het specifieke malariagebied op aarde, de verblijfsduur, de gezondheidstoestand van de betrokken persoon (eventuele zwangerschap) en andere geneesmiddelen die de persoon gebruikt. Alle onderstaande medicijnen zijn **synthetische middelen**.

- Nivaquine® (werkzame stof chloroquine)
- Lariam® (werkzame stof mefloquine);
- Paludrine® (werkzame stof proguanil);
- Malarone™ (werkzame stoffen atovaquon en proguanil);
- Daraprim® (werkzame stof pyrimethamine);

Opdracht: Zoek van elk van bovenstaande medicijnen enkele voor- en nadelen op. Zoek op de naam van het geneesmiddel of op de naam van de werkzame stof.
Gebruik onderstaande websites als start voor je informatiezoektocht:
Malariapillen wereldkaart: http://www.vaccinatiesopreis.nl/malariapillen-wereldkaart/
Apotheken in Nederland: http://www.apotheek.nl/

Didactische tips & suggesties:
Het is leuk om leerlingen over deze activiteit een wetenschappelijke poster presentatie te laten geven. Verdeel bijvoorbeeld de medicijnen onder de leerlingen of laat ze van alle medicijnen de voor- en nadelen presenteren en concluderen welk medicijn ze zelf zouden aanraden. Zeker als je de leerlingen aan het eind van de module een wetenschappelijke poster presentatie laat geven over hun eigen ontworpen analoog (activiteit 15), kan deze presentatie goed dienen als oefening voor de uiteindelijke presentatie.

Functie:
Zie activiteit 3

Uitwerkingen activiteit 2: overzicht

Medicijn	**Werkzame stof**	**Voordelen**	**Nadelen**	**Bijwerkingen[1]** **Regelmatig** / soms / *zelden*	**Inname**
Nivaquine®	Chloroquine	Geen beperkingen qua eten/drank/ auto. Heel goedkoop (zo'n 2 euro per maand)	Heeft een wisselwerking met veel medicijnen (voornamelijk middelen tegen hartritmestoornissen)	*Verminderde eetlust*	1x / week
Lariam®	Mefloquine	Geen beperkingen qua eten/drank/ auto (behalve in geval van duizeligheid) Goedkoop (zo'n 12 euro per maand)	Weinig bekend over gebruik bij zwangerschap.	Slaapslaap-stoornissen, *angst, hoofdpijn, draaierigheid, jeuk en oogklachten*	1x / week
Paludrine®	Proguanil	Geen beperkingen. Goedkoop (zo'n 8 euro per maand)	-	-	1x / dag
Malarone™	Atovaquon en proguanil	Geen beperkingen qua eten/drank/ auto (soms duizeligheid)	Niet gebruiken bij zwangerschap. Hoge kosten (68 euro per maand)	Maagdarmklachten, hoofdpijn, *verminderde eetlust, hoesten*	1x / dag
Daraprim®	Pyrimethamine	Geen beperkingen qua eten/drank/ auto	Veel resistentie opgetreden. Heeft een wisselwerking met medicijnen tegen hiv en hepatitis C. Niet gebruiken bij zwangerschap.	**Verminderde aanmaak van bloedcellen**, maagdarmklachten, hoofdpijn, *duizeligheid.*	1x / week

Activiteit 3: Noodzaak voor nieuwe medicijnen tegen Malaria

We hebben nu gekeken naar de verschillende manieren om nieuwe medicijnen te ontwikkelen. Maar waarom is het nu zo belangrijk dat er constant nieuwe medicijnen tegen Malaria worden ontwikkeld, als er ook al zoveel bestaan? Met behulp van de volgende activiteit ga je dat onderzoeken.

Opdracht: Bestudeer Fragmenten 1 t/m 3 over lopende onderzoeken naar nieuwe medicijnen tegen Malaria. Beantwoord dan de volgende vragen.

d) Waar in het lichaam kan de malariaparasiet zich bevinden? (zie ook Figuur 2)
e) Wetenschappers proberen de mechanismen van de malariaparasiet te ontrafelen om vervolgens gericht medicijnen te kunnen ontwikkelen. Noem een aantal aangrijpingspunten die in de fragmenten zijn genoemd.
f) Waarom is het nodig dat er continu nieuwe medicijnen worden ontwikkeld tegen Malaria? Er zijn meerdere redenen mogelijk.

Didactische tips & suggesties:

Kunnen leerlingen gewoon goed zelfstandig doornemen.

Functie:

Voor activiteit 1, 2 en 3 geldt:

- Oriëntatie op het onderwerp malaria en medicijnontwikkeling
- Aansluiten bij wat leerlingen weten over malaria
- Motiverend

Uitwerkingen activiteit 3:

a) De parasiet kan zich eigenlijk in het hele lichaam bevinden. Nadat de mug (met de parasiet in zich) de mens heeft geprikt, komt de parasiet in het lichaam van de mens terecht. Nadat de parasiet zich naar de lever heeft verplaatst, gaat het zich daar vermenigvuldigen. Vervolgens kunnen de parasieten zich in rode bloedcellen in de bloedbaan nestelen, waar ze zich nog verder vermenigvuldigen. Zo kunnen de parasieten naar het hele lichaam toe.
b) Wetenschappers kunnen medicijnen ontwikkelen ter *preventie*, als *therapie* en om de *transmissie* te voorkomen. Op die manier wordt dus gezocht naar een aangrijpingspunt om
   1) te voorkomen dat de parasiet het lichaam binnen dringt (preventie);
   2) de parasiet te bestrijden in het lichaam (therapie);
   3) de overdracht van de mens naar de mug te voorkomen (transmissie).

   Ook zou je kunnen zeggen dat de volgende aangrijpingspunten gevonden zijn:
   - DNA: er is een klein stukje DNA gevonden in het genoom dat verantwoordelijk is voor de resistentie.
   - Specifieke enzymen die betrokken zijn bij de stofwisseling van de parasiet.

c) Steeds meer malaria parasieten raken resistent tegen verschillende bestaande medicijnen. Dit betekent dat sommige bestaande medicijnen niet meer effectief zijn tegen de resistente parasieten. Om resistentie tegen te gaan, zullen er continue nieuwe medicijnen ontwikkeld moeten worden waar de parasieten nog niet resistent tegen zijn geworden. Op die manier zullen ook de resistente malaria parasieten bestreden kunnen worden.

Hoofdstuk 2. De ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen

Activiteit 4: Verschillende manieren van aanpak

Opdracht: Maak een mindmap waarbij de *ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen* centraal staat. In deze mindmap moeten de 3 verschillende manieren van aanpak die in hoofdstuk 2 besproken zijn in ieder geval terugkomen. Hiervoor ga je informatie op internet opzoeken. Als je andere manieren vindt, kun je deze ook aan je mindmap toevoegen. Denk voor deze opdracht bijvoorbeeld aan de volgende vragen:

- Wat zijn de voor- en nadelen van de verschillende manieren?
- Wat zijn de randvoorwaarden voor het gebruik van de verschillende manieren van aanpak?

Lees de inleidende tekst van hoofdstuk 2. Gebruik verder onderstaande website als start voor je informatiezoektocht. Het artikel kun je opzoeken met behulp van de titel.

WikiPedia:	https://en.wikipedia.org/wiki/High-content_screening https://en.wikipedia.org/wiki/Hit_to_lead
Artikel:	Back to the future: lessons learned in modern target-based and whole-cell lead optimization of antimalarials (door A.K. Chatterjee).

Didactische tips & suggesties:

Kunnen leerlingen gewoon goed zelfstandig doornemen.

Functie:

- Inzoomen op manieren van medicijnen ontwikkeling in de praktijk

Uitwerkingen activiteit 4:

Voorbeeld opzet voor een mindmap: zie bijlage 1

Activiteit 5: Affiniteit inhibitor met enzym

Opdracht:

In Figuur 3 is de *lead finding* schematisch beschreven. Bestudeer in Figuur 3 enzym R en de inhibitors A, B en C nauwgezet. Het is te verwachten dat 1 van de inhibitors de beste affiniteit met enzym R heeft.

c) Doe een uitspraak over welke van de inhibitors van figuur 3 de beste affiniteit heeft met enzym R. Motiveer je antwoord.
d) Welke andere factoren kun je bedenken die van invloed zijn op de binding van een inhibitor aan een enzym?

Didactische tips & suggesties:

Kunnen leerlingen gewoon goed zelfstandig doornemen.

Functie:

- Affiniteit voorspellen op basis van 2D structuur

- Nadenken over andere factoren die affiniteit bepalen: hopen dat ze iets over 3D structuur en/of interacties van enzym en inhibitor noemen.

Uitwerkingen activiteit 5:

a) Inhibitor A heeft de beste affiniteit met enzym R. Inhibitor A heeft namelijk de beste interactie met enzym R, omdat deze inhibitor het beste 'past' vergeleken met de andere inhibitors.
b) Ze kunnen denken aan *externe* factoren, zoals pH en temperatuur. Maar ook factoren die met de *structuur* en *functionele groepen* van de inhibitor of het enzym te maken hebben, zoals mogelijke elektrostatische interacties, dipool-dipool interacties, hydrofoob, hydrofiel, 3D structuur, etc.
NB: een hogere concentratie van de inhibitor zorgt er wel voor dat meer enzymen gebonden zijn aan de inhibitor, maar dit heeft geen invloed op de binding op zich.

Activiteit 6: Lead optimization van pyrimethamine

In activiteit 2 heb je van een aantal **malariaprofylaxe** de voor- en nadelen uitgezocht. De werkzame stoffen (leads) in die geneesmiddelen zijn bijvoorbeeld chloroquine, proguanil en pyrimethamine. Van sommige van deze leads is de werking op moleculaire schaal niet geheel bekend. Voor pyrimethamine is de werking wel in detail bekend. Het doeleiwit van pyrimethamine is het parasitaire eiwit *dihydrofolaat reductase* (DHFR). DHFR is een essentieel eiwit voor de vermenigvuldiging van de malariaparasiet.

d) Wat is de functie van DHFR in de cel? Welk cellulair proces wordt door DHFR gekatalyseerd? Waarom is DHFR een essentieel eiwit voor het voortbestaan van de cel? Gebruik onderstaande websites om een antwoord te verkrijgen op de vraag:

Wikipedia http://en.wikipedia.org/wiki/Dihydrofolate_reductase
Tocrisbioscience
http://www.tocris.com/pharmacologicalBrowser.php?ItemId=187788&Information=True#.U1-Ruvl_tCh

Pyrimethamine wordt echter steeds minder toegepast als geneesmiddel tegen malaria. De reden hiervoor is dat vele parasieten **resistent** zijn geworden voor pyrimethamine. Het parasitaire DHFR enzym heeft namelijk veranderingen ondergaan waardoor pyrimethamine minder goed (of niet meer) als **inhibitor** van DHFR functioneert. Er is al veel onderzoek gedaan naar DHFR, en de werking van pyrimethamine is in detail onderzocht. Zowel het doeleiwit (DHFR) als de lead (pyrimethamine) zijn dus bekend.

e) Beargumenteer waarom lead optimization een passende manier van aanpak is gezien wat we al weten over pyrimethamine en DHFR.

Door pyrimethamine aan te passen, kun je een lead maken die ook geschikt is voor parasieten die resistent geworden zijn voor pyrimethamine zelf. In Fragment 4 staat de opdracht van deze module: *Lead optimization van pyrimethamine.* Lees dit fragment door en kijk nog eens terug naar je antwoorden van activiteit 5.

f) Maak een stappenplan voor de uitvoering van deze opdracht en beargumenteer de stappen. Denk daarbij aan onderstaande aspecten:

- Welke informatie moet er worden ingewonnen?
- Wat moet er allemaal worden uitgezocht?
- Welke experimenten moeten er worden uitgevoerd?

Didactische tips & suggesties:

Leerlingen vinden opdracht 6c vaak lastig, omdat ze niet goed weten wat ze precies moeten doen. Het is ook een redelijk open opdracht, maar dat is ook bewust zo gedaan om de leerlingen zelf te laten nadenken over hoe ze de opdracht aan gaan pakken. Ze hoeven ook nog niet precies te weten wat ze gaan doen en de stappen op te schrijven die ze daadwerkelijk uit gaan voeren. Het is vooral belangrijk om de leerlingen te laten nadenken over wat zij denken dat ze nodig hebben of wat ze moeten weten om uiteindelijk de opdracht uit te voeren.

Functie:

- Onderzoeken wat DHFR is en wat het doet;
- Eerste aanzet tot procedurele gang van zaken: hoe gaan ze het uitvoeren van de opdracht aanpakken? Beargumenteren van de aanpak.

Uitwerkingen activiteit 6:

a) DHFR (dihydrofolate reductase) is een enzym dat dihydrofolaat omzet in tetrahydrofolaat. Hierbij gebruikt DHFR NADPH als cofactor. De tetrahydrofolaat die door DHFR gevormd wordt, is essentieel voor de groei en voortplanting van de cel. Tetrahydrofolaat is namelijk nodig is voor de vorming van purine en thymidinemonofosfaat, welke beide bouwstenen voor DNA zijn. Zonder DHFR kan er dus geen DNA gebouwd worden en kunnen de cellen zich niet voortplanten en groeien. Daarom is DHFR een essentieel eiwit voor het voortbestaan van de cel.

b) Whole-cell screening wordt gebruikt als zowel de lead als het doeleiwit nog niet bekend zijn. Target-based screening kan gebruikt worden wanneer het doeleiwit al wel bekend is, maar de lead nog niet. Lead optimization kan gebruikt worden als zowel het doeleiwit als de lead al bekend zijn. In dit geval is zowel de lead (pyrimethamine) als het doeleiwit (DHFR) bekend, dus hoef je daar niet meer naar op zoek te gaan. Daarom is lead optimization in dit geval een passende manier van aanpak.

c) Eerst moet je op zoek gaan naar wat de *structuur* van pyrimethamine en de verschillende varianten van DHFR is. Je moet weten *waar* pyrimethamine en DHFR aan elkaar binden. Vervolgens kun je in Arguslab testen *hoe goed* pyrimethamine en DHFR aan elkaar binden. Als je pyrimethamine dan systematisch iets *verandert*, kun je kijken of pyrimethamine hierdoor beter of slechter bindt aan DHFR. Je moet ervoor zorgen dat pyrimethamine *goed bindt aan DHFR,* maar *slecht bindt aan het humane DHFR*, omdat je alleen het parasitaire DHFR wilt remmen. De beste resultaten zorgen dan voor het beste analoog.

Hoofdstuk 3. Lead target DHFR onder de loep

Activiteit 7: De 3D structuur van DHFR

Van veel eiwitten is de 3D structuur onderzocht, deze zijn online te vinden in de Protein Data Bank (PDB). Op http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do is deze databank te vinden. Op deze website zijn de eiwitstructuren en specificaties van 100.000 eiwitten beschikbaar. We gaan in dit project verschillende eiwitten van deze databank gebruiken. In deze activiteit maak je voor het eerst kennis met het softwareprogramma ArgusLab en de Protein Data Bank.

Opdrachten:

Bezoek de Protein Data Bank en zoek het DHFR eiwit op. Dit kun je doen met behulp van de code van Wild-type DHFR: 1j3i. Kijk eens wat rond op de PDB site.

c) Uit hoeveel aminozuren bestaat het DHFR eiwit?

Laad de structuur van wildtype DHFR (PDB code 1j3i) in Arguslab en zoom in op de *primaire*, *secondaire*, *tertiaire* en *quarternaire* structuur. Gebruik hiervoor het software programma ArgusLab, dit programma staat al op de computer geïnstalleerd. In de manual, die je ook uitgereikt hebt gekregen, staat de procedure die je moet volgen om deze opdracht uit te kunnen voeren. .

d) Uit hoeveel ketens bestaat het DHFR eiwit?

Didactische tips & suggesties:

Sommige leerlingen vinden het moeilijk om informatie op te zoeken op de PDB site. Laat ze een beetje rondkijken op de site om te ontdekken wat er allemaal te vinden is. De vragen zijn er ook op gericht om zowel inzicht te krijgen in de structuur van DHFR, maar ook om de PDB site een beetje door te kijken. Maar soms moet je ze dus een beetje sturen naar waar ze de informatie precies kunnen vinden.

Vanaf nu gaan de leerlingen ook aan de slag met Arguslab: soms kan dit wel tot wat frustratie bij de leerlingen leiden. Zo is het bekend dat Arguslab af en toe vast kan lopen. Om dit zoveel mogelijk te voorkomen, is het belangrijk dat de leerlingen hun bestanden zo vaak mogelijk *opslaan*. Als je Arguslab namelijk afsluit zonder het bestand eerst op te slaan, kan het programma snel vastlopen. Zolang alles opgeslagen is, gaat het goed.

Functie:

- Instructie PDB site en instructie Arguslab;
- Leerling heeft inzicht dat eiwitten bestaan uit primaire structuur (aminozuren) en dat deze zich vouwen in 3D structuur (secundair, tertiair en quaternaire structuur);

Uitwerkingen activiteit 7:

a) DHFR bestaat uit 608 aminozuren.
b) DHFR bestaat uit 4 ketens.

Activiteit 8: De pyrimethamine bindingsite van DHFR

De bindingsite is de plek waar de lead aan het target bindt en de active site is de plek waar het target bepaalde reacties katalyseert. De **bindingsite** en active site hoeven dus niet altijd gelijk aan elkaar te zijn. Voor gerichte lead optimization van pyrimethamine is het noodzakelijk te weten op welke plaats pyrimethamine zich bindt aan DHFR. De bindingsite van pyrimethamine aan DHFR is bepaald door kristallen te maken van pyrimethamine gebonden aan DHFR. Pyrimethamine bindt aan de active site van DHFR, dus in dit geval zijn de bindingsite en de active site wel gelijk aan elkaar. Voor **wildtype** DHFR wordt de bindingssite (dus ook de active site) gevormd door aminozuur residuen Ile-14, Cys-15, Asp-54, Phe-58, Pro-113, Ile-164[11].

Zoals je weet, is een eiwit een lange keten van aminozuren die met peptideverbindingen aan elkaar verbonden zijn. Elk aminozuur heeft zijn eigen plek binnen het eiwit. De cijfers achter de aminozuren geven de plek van het aminozuur in de keten aan. Zo is bijvoorbeeld het 14e aminozuur van DHFR Isoleucine (Ile-14). De volgende vragen gaan over de bindingsite en welke aminozuren in de bindingsite aanwezig zijn.

f) Hoe noem je de vorm van inhibitie van pyrimethamine aan DHFR? Geef een toelichting op je antwoord.

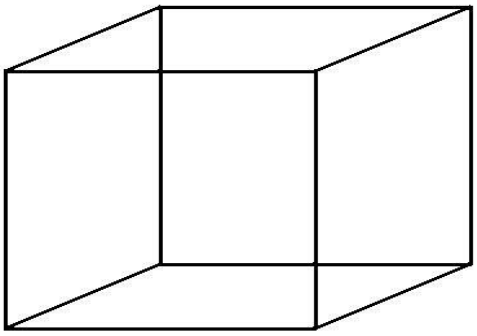
g) Zoek in Binas Tabel 67C de structuurformules op van de aminozuren die de bindingsite vormen. Bekijk de **functionele groepen** van deze aminozuren en geef aan welke moleculaire interacties er mogelijk zijn. Focus vooral op de *restgroepen* van de aminozuren.

h) Je krijgt van je docent een werkblad waarop de bindingssite van DHFR in 2D weergegeven is. Geef op dit werkblad aan waar de mogelijke moleculaire interacties die je bij vraag b gevonden hebt, zich bevinden.

Nu gaan we met behulp van het programma Arguslab kijken naar de 3D structuur van de bindingssite. Zoom in op de bindingsite van pyrimethamine m.b.v. het software programma ArgusLab. In de manual staat de procedure beschreven.

i) Geef schematisch weer waar de verschillende aminozuren van de bindingsite zich t.o.v. elkaar bevinden. Gebruik eventueel een kubus (zie Figuur 7) om de positie van de aminozuren en functionele groepen t.o.v. van elkaar weer te geven. Dit kan helpen om een goed inzicht te krijgen in de 3D structuur van de bindingssite.

j) Vergelijk de 3D structuur van vraag d met de 2D structuur van vraag c. Geef aan wat je



Figuur 7. Teken de aminozuren schematisch in de kubus.

[11] Bron 2: Yuvaniyama J., Chitnumsub P., Kamchonwongpaisan S., Vanichtanankul J., Sirawaraporn W., Taylor P., Walkinshaw M.D., Yuthavong Y. (2003). Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures. *Nat. Struct. Biol. 10*(*5*), 357-65.

opvalt aan deze verschillende weergaven en geef aan wat de toegevoegde waarde is van de 3D structuur.

Didactische tips & suggesties:

De werkbladen zijn aangepast op basis van de 2D structuur van de bindingssite en interacties die op de PDB site te vinden zijn. Deze structuur is alleen niet helemaal consistent: soms wordt de restgroep wel helemaal uitgetekend (zoals bij Phe bijvoorbeeld), maar soms ook niet (zoals bij Ile bijvoorbeeld). Laat de leerlingen dus goed kijken naar wat ze precies op de werkbladen kunnen vinden.

Let op: dit is het werkblad *zonder* pyrimethamine in de bindingssite van WT DHFR. Het werkblad waarin pyrimethamine wel aangegeven is, hebben de leerlingen namelijk pas nodig bij activiteit 15.

Functie:

- Inzicht krijgen in wat de bindingssite is;
- Inzicht krijgen in 3D structuur van bindingssite;
- De functionele groepen van de bindingssite noemen en aangeven welke interacties er mogelijk zijn met de bindingssite.

Uitwerkingen activiteit 8:

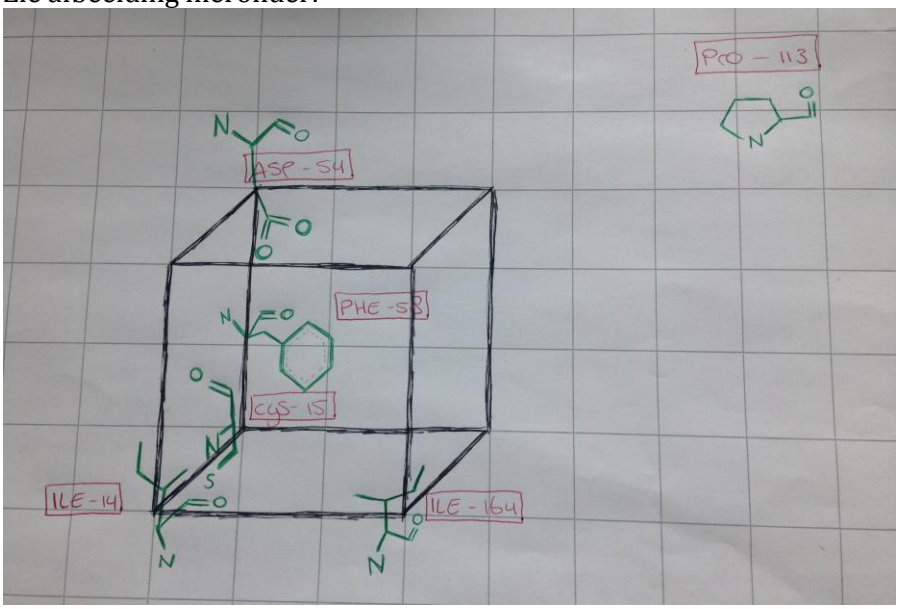
a) Dit is competitieve inhibitie. Zowel het substraat als de inhibitor binden op dezelfde plek: de bindingssite en de active site zitten namelijk op dezelfde plek. Er is dus sprake van concurrentie tussen het substraat en de inhibitor.

b) De volgende interacties zijn mogelijk, op basis van de *restgroepen*. Uiteraard kan de basisstructuur van elk aminozuur ook interacties aangaan, maar dit is voor alle aminozuren hetzelfde.

- Isoleucine (Ile): Vanderwaalsbinding,
- Cysteine (Cys): Vanderwaalsbinding, zwavelbrug
- Asparaginezuur (Asp): Vanderwaalsbinding, waterstofbrug
- Phenylanaline (Phe): Vanderwaalsbinding, hydrofobe interacties
- Proline (Pro): Vanderwaalsbinding, hydrofobe interacties

c) Zie bijlage 2

d) Zie afbeelding hieronder:



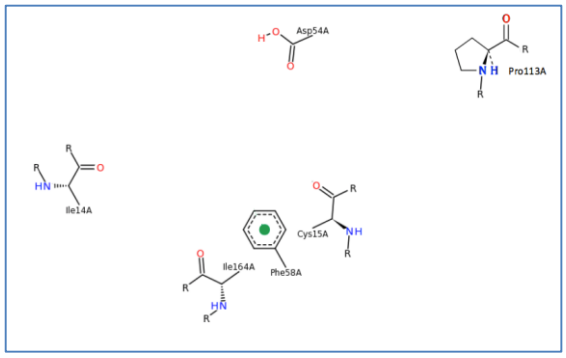
e) In de 3D structuur kun je beter zien hoe de aminozuren zich t.o.v. elkaar bevinden. Vergeleken met de 2D structuur kun je bij de 3D structuur namelijk ook de diepte zien. Dus je ziet of de aminozuren voor of achter elkaar staan.

Hoofdstuk 4. Lead pyrimethamine onder de loep

Activiteit 9: Binding van pyrimethamine aan wild type DHFR 1j3i.

Opdracht: Bouw het molecuul pyrimethamine in Arguslab zoals dit in de manual staat beschreven.

b) Op basis van de antwoorden bij activiteit 8 kun je een voorspelling doen over de interacties tussen pyrimethamine en de aminozuren in de DHFR bindingssite. Welke interacties zijn mogelijk tussen pyrimethamine en de bindingssite van DHFR? Teken hiervoor pyrimethamine op het werkblad dat je van je docent krijgt. Denk na over de oriëntatie van pyrimethamine in de bindingssite. Geef vervolgens aan *waar* en *welke* interacties er mogelijk zijn tussen pyrimethamine en DHFR. Dit werkblad ziet er hetzelfde uit als het plaatje hiernaast:



Figuur 10. Voorbeeld werkblad:

Didactische tips & suggesties:

Let op: dit is hetzelfde werkblad als het werkblad dat de leerlingen bij activiteit 8 hebben gebruikt, namelijk het werkblad met de bindingssite van WT DHFR *zonder* pyrimethamine. Je kunt ze hiervoor het beste een *nieuw* werkblad uitreiken, omdat ze waarschijnlijk weinig plek meer over hebben om pyrimethamine te tekenen in het werkblad.

Functie:

- Instructie Arguslab: moleculen bouwen;
- Mogelijke interacties tussen lead en doeleiwit aangeven.

Uitwerkingen activiteit 9:

Zie bijlage 3
NB: Interacties die getekend kunnen worden, zijn:

- H-bruggen
- Vanderwaalsbindingen
- Hydrofobe interacties

Interacties die *niet* getekend mogen worden, zijn:

- Zwavelbruggen, want pyrimethamine bevat geen S atoom.
- Ion bindingen, want pyrimethamine heeft geen lading.

Activiteit 10: Docken van pyrimethamine aan wild type DHFR 1j3i

Opdracht: Dock pyrimethamine aan de bindingsite van wildtype DHFR 1j3i m.b.v. ArgusLab. In de manual staat de procedure om dit in ArgusLab te doen.

c) Wat is bij de binding van pyrimethamine aan wildtype DHFR 1j3i de meest gunstige pose? Wat is de bindingsenergie (in kcal/mol) bij die pose?

d) Vergelijk deze pose ook met de pose die je bij activiteit 9 had getekend. Vergelijk ook de interacties die je verwacht had te vinden tussen pyrimethamine en DHFR. Kun je deze interacties terugvinden? Zo nee, welke interacties zijn er anders dan je had verwacht? Of mis je bepaalde interacties? Kun je dit verklaren?

Didactische tips & suggesties:

Soms gaat er met het docken iets fout en geeft Arguslab een foutmelding. Op zo'n moment hebben de leerlingen één van de stappen niet goed gevolgd. Als ze de stappen namelijk stap voor stap goed volgen, kan er geen foutmelding ontstaan. Laat de leerlingen de stappen van het voorbereiden van de docking dan opnieuw volgen en de docking opnieuw uitvoeren.

De waarden die de leerlingen als bindingsenergie vinden, kunnen onderling wat verschillen. Dit is o.a. afhankelijk van de grootte van de kubus (zie instructiemanual blz. 10/11). Het is wel belangrijk dat de leerlingen zelf telkens dezelfde waarden voor deze kubus gebruiken, zodat ze de verschillende analogen en DHFR varianten met elkaar kunnen vergelijken.

Ook denken veel leerlingen dat de 'bumps' de vanderwaalsbindingen voorstellen, hoewel dit nergens genoemd wordt.

Functie:

- Leerlingen kunnen pyrimethamine en WT DHFR docken in Arguslab;
- Leerlingen kunnen de verschillende poses van pyrimethamine interpreteren in relatie tot de bindingsenergie;
- Leerlingen kunnen moleculaire interacties tussen pyrimethamine en DHFR herkennen en benoemen.

Uitwerkingen activiteit 10:

a) De meest gunstige pose is pose 1, omdat deze de laagste waarde voor de bindingsenergie geeft. Als de kubus een grootte van
X = 17.288
Y = 11.310
Z = 16.184
aanneemt, komt pose 1 uit op een waarde van -10,35 Kcal/mol.

b) De pose komt niet echt overeen met de pose die bij activiteit 9 getekend is.
Voorbeeld 1: bij activiteit 9 werd voorspeld dat de N atomen richting beide Ile aminozuren zouden gaan om daar waterstofbruggen mee te vormen. In Arguslab blijkt pyrimethamine wat meer gedraaid te zijn, zodat maar een van de N-atomen richting de twee Ile aminozuren gericht staan (bij 'show hydrogen bonds' laat hij ook een waterstofbrug zien tussen een NH_2 groep en ILE-164). Maar Arguslab laat ook waterstofbruggen zien met aminozuren die niet in de bindingssite zitten. Dus misschien heeft pyrimethamine nog interactie met andere aminozuren, waar wel waterstofbruggen gevormd kunnen worden.
Voorbeeld 2: bij activiteit 9 werd voorspeld dat de N atomen richting Asp zouden gaan staan, zodat Chloor meer naar de Ile aminozuren zou komen. Dit zie je niet terug in Arguslab, omdat er helemaal geen waterstofbruggen met Asp gevormd worden en is Chloor juist wat meer tussen Asp, Cys en Ile in gaan staan. Daar heeft Chloor wel wat meer ruimte, wat wel weer logisch is, omdat Chloor een redelijk groot atoom is. Zie bijlage 4 voor een afbeelding.

Activiteit 11: Interacties bij enzym-substraat complex

We hebben nu van zowel het wildtype als de double mutant een docking uitgevoerd aan pyrimethamine en bij beiden berekend wat de bindingsenergie is. In deze activiteit ga je onderzoeken wat je nu precies kunt zeggen over deze bindingsenergie.

Opdracht: Lees fragment 5 en beantwoord de volgende vragen:

g) Geef de evenwichtsvoorwaarde voor de vorming van het enzym-substraat complex.

h) Welke eigenschappen van 1) het substraat en 2) het enzym zouden invloed hebben op vorming van dit enzym-substraat complex?

i) Geef de evenwichtsvoorwaarde voor de vorming van het enzym-inhibitor complex. Wat gebeurt er met de concentratie van het enzym-substraat complex als er een inhibitor van het enzym toegevoegd wordt?

j) Waarom is de bindingsenergie die je gevonden hebt bij activiteit 10 een negatief getal? Wat kun je zeggen over de hoeveelheid energie die het kost om een binding te vormen dan wel dezelfde binding te verbreken?

k) Zou de werking van een inhibitor optimaal zijn bij een grote of kleine waarde van *Ki*? Leg je antwoord uit.

l) Leg uit dat een lage *Ki* correspondeert met een relatief hoge bindingsenergie tussen enzym en inhibitor.

Functie:

- **Interpretatie van enzym activiteit Ki ;**
- **Notie dat een lage Ki correspondeert met een relatief hoge bindingsenergie tussen enzym en inhibitor;**
- **Notie dat inhibitor optimaal werkt bij een lage waarde van Ki;**
- **Inzicht dat er competitieve evenwichten bestaan tussen enzym/substraat en enzym/inhibitor;**

Uitwerkingen activiteit 11:

a) $K = [ES] / [E]x[S]$

b) De structuur van zowel het enzym als het substraat hebben invloed op de vorming van dit enzym-substraat complex. Afhankelijk van de structuur kunnen bepaalde interacties (zoals waterstofbruggen of ionbindingen) wel of niet plaatsvinden. Hoe meer en hoe sterker deze interacties zijn, hoe beter dit enzym-substraat complex gevormd zal worden.

c) $K = [EI] / [E]x[I]$
Als er een inhibitor wordt toegevoegd, zal deze inhibitor competitie aangaan met het substraat, omdat ze allebei aan het enzym zullen binden. Omdat het enzym dus ook enzym-inhibitor complexen zal gaan vormen, zullen er dus minder enzym-substraat complexen gevormd worden en zal de concentratie van de enzym-substraat complexen omlaag gaan.

d) Als de bindingsenergie negatief is, betekent dit dat er energie vrij komt bij deze binding. Om deze binding te verbreken, heb je energie nodig. Om deze binding te verbreken, heb je evenveel energie nodig als dat er vrij komt wanneer de binding gevormd wordt.
Hoe negatiever de bindingsenergie is, hoe sterker de interactie tussen de twee moleculen is en hoe moeilijker het is om deze binding weer te verbreken.

e) De werking van een inhibitor is optimaal bij een kleine waarde van Ki. Bij een kleine waarde van Ki zijn er namelijk veel inhibitors aan het enzym gebonden, en zal het enzym dus minder aan het substraat kunnen binden. Dit betekent dat de inhibitor goed z'n werk kan doen.

f) Bij een lage waarde van Ki zijn er veel inhibitors aan het enzym gebonden. Dit betekent dat de inhibitor en het enzym een goede interactie met elkaar hebben. Bij een goede interactie heb je een lage bindingsenergie (wat correspondeert met een zo'n negatief mogelijk getal).

Hoofdstuk 5. Testen en ontwerpen van pyrimethamine-analogen als DHFR remmer

Activiteit 12: Docken van double mutant DHFR 1j3j

DHFR double mutant 1j3j heeft twee mutaties ondergaan en heeft qua 3D structuur dus wijzigingen t.o.v. wildtype DHFR 1j3i. Deze wijzigingen bij deze mutant bevinden zich *buiten* de bindingssite, maar het kan in zo'n geval wel mogelijk zijn dat de bindingssite zelf iets anders opgebouwd is.

Opdracht: Voer de docking ook uit voor de double mutant DHFR 1j3j. Ook deze DHFR variant kun je via de Protein Data Bank openen in ArgusLab. Voer hiervoor dezelfde stappen uit zoals je bij activiteit 7 voor DHFR wildtype hebt gedaan, alleen nu voor mutant DHFR 1j3j. De aminozuren die de bindingsite vormen voor de DHFR mutant bevinden zich op dezelfde plek als bij het wildtype DHFR.

c) Wat is bij de binding van pyrimethamine aan double mutant DHFR 1j3j de meest gunstige pose? Wat is de bindingsenergie (in kcal/mol) bij die pose?
d) Is er verschil in de berekende bindingsenergieën tussen het wildtype DHFR (zie activiteit 10) en deze mutant? Zo ja, wat zijn deze verschillen? Is er een verschil in de meest gunstige pose bij wildtype DHFR en double mutant DHFR? Kun je dit verklaren?

Didactische tips & suggesties:

Soms gaat er met het docken iets fout en geeft Arguslab een foutmelding. Op zo'n moment hebben de leerlingen één van de stappen niet goed gevolgd. Als ze de stappen namelijk stap voor stap goed volgen, kan er geen foutmelding ontstaan. Laat de leerlingen de stappen van het voorbereiden van de docking dan opnieuw volgen en de docking opnieuw uitvoeren.

De waarden die de leerlingen als bindingsenergie vinden, kunnen onderling wat verschillen. Dit is o.a. afhankelijk van de grootte van de kubus (zie instructiemanual blz. 10/11). Het is wel belangrijk dat de leerlingen zelf telkens dezelfde waarden voor deze kubus gebruiken, zodat ze de verschillende analogen en DHFR varianten met elkaar kunnen vergelijken. NB: Het kan zijn dat leerlingen bij de double mutant uitkomen op een lagere bindingsenergie dan bij het wildtype. Let erop dat leerlingen in ieder geval inzien dat een *lagere* bindingsenergie overeenkomt met een *betere* binding. Het kan dus zijn dat leerlingen concluderen dat de double mutant beter bindt aan pyrimethamine, volgens hun resultaten bij Arguslab.

Functie:

- Ontdekken dat mutant DHFR minder affiniteit heeft met pyrimethamine;
- Dit verklaren a.d.h.v. de bindingsenergie.

Uitwerkingen activiteit 12:

a) De meest gunstige pose is pose 1, omdat deze de laagste waarde voor de bindingsenergie geeft. Als de kubus een grootte van
X = 17.288
Y = 11.310
Z = 16.184
aanneemt (dezelfde waardes die ook bij activiteit 10 gebruikt zijn), komt pose 1 uit op een waarde van -10,20 Kcal/mol.

a) Ja, er is een verschil in de berekende bindingsenergieën tussen het wildtype DHFR en deze mutant. Het wildtype had namelijk een bindingsenergie van -10,35 kcal/mol en de mutant had een bindingsenergie van -10,20 kcal/mol. Hoewel het verschil wel minimaal is, betekent dit dat pyrimethamine beter bindt aan wildtype DHFR, omdat deze bindingsenergie lager is dan de bindingsenergie bij de mutant. Als je de twee posen van pyrimethamine bij wildtype en double mutant DHFR met elkaar vergelijkt, is er geen verschil te zien. Dit is ook wel logisch, omdat de bindingsite bij wildtype en double mutant DHFR hetzelfde zijn (zie bijlage 4).

Activiteit 13: Testen van pyrimethamine-analogen

c) Hoe is de structuur van pyrimethamine veranderd bij de twee analogen uit tabel 1? Teken hiervoor de structuur van beide analogen.

d) Test deze pyrimethamine-analogen. Volg de aanwijzingen van de docent op over welke analogen en welke mutanten je moet testen (je hoeft ze namelijk niet allemaal te doen). Bereken de bindingsenergie met Arguslab en gebruik hierbij de (nieuw opgedane) kennis en de achtergrondinformatie die je tot nu toe hebt gekregen en behandeld in deze module. Noteer je resultaten in tabel 1.

Didactische tips & suggesties:

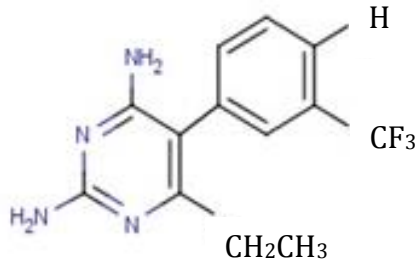
Het is verstandig om het testen van de verschillende analogen op de verschillende DHFR mutanten (zie tabel 1) te verdelen onder de leerlingen. Het kost namelijk best veel tijd om deze analogen eerst te maken en vervolgens ook te docken op alle verschillende varianten van DHFR. Als je dit verdeelt onder de leerlingen, kunnen ze elkaars resultaten overnemen en dit gebruiken. Het is wel aan te raden om alle combinaties ten minste door 2 groepjes te laten uitvoeren, zodat je de gemiddelde waardes van deze bindingsenergieën kunt gebruiken.

Functie:

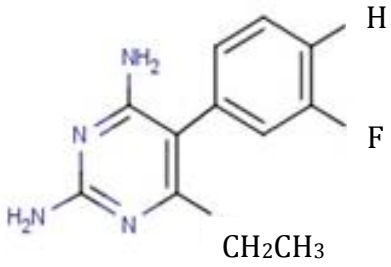
- Zien hoe de structuur van pyrimethamine veranderd is bij de twee voorbeeld analogen.
- Berekenen van bindingsenergie van verschillende pyrimethamine analogen en DHFR varianten.

Uitwerkingen activiteit 13:

a) **Analoog 1 :**



Analoog 2:



b)

Mutanten DHFR	Wildtype 1j3i	Double mutant 1j3j C59R + S108N	Quadruple mutant 1j3k N51I + C59R + S108N + I164L
Pyrimethamine analogen	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**	**Bindingsenergie Kcal/mol**
Pyrimethamine X = Cl Y = H R = CH_2CH_3	-10,35	-10,20	-10,63
Analoog 1 (AR6) X = H Y = CF_3 R = CH_2CH_3	-9,75	-11.11	-10,92
Analoog 2 (AR4) X = H Y = F R = CH_2CH_3	-10,31	-9,67	-10.30

Activiteit 14: In vitro onderzoek

In geneesmiddelonderzoek volgt na lead optimization altijd nog een ***in vitro*** onderzoek. In dit preklinische onderzoek wordt de geoptimaliseerde lead getest op cellen en weefsels die in het laboratorium worden gekweekt. Met *in vitro* onderzoek kan de werking van het antifolaat op geselecteerde cellen goed worden onderzocht. Echter, het eventuele effect op andere cellen en/of bijwerkingen voor het organisme niet. In Fragment 7 staat meer informatie over de preklinische onderzoeksfase.
Het is niet mogelijk om op school een in vitro onderzoek te doen naar de geteste pyrimethamine-analogen in Tabel 1. Daarvoor ontbreken de benodigde instrumenten, materialen, chemicaliën en cellen. Daarom maken we in deze opdracht gebruik van resultaten die door andere onderzoekers zijn verzameld over een aantal pyrimethamine analogen. In Tabel 2 staan de resultaten van enkele kinetiek experimenten met de pyrimethamine-analogen en wild type DHFR, mutanten die ook in Tabel 1 staan én humaan DHFR. De snelheid van de reacties, in aanwezigheid van een pyrimethamine-analoog, is tijdens het proces gevolgd door de absorptie te meten bij 340nm. De resultaten zijn omgerekend naar ***K*i** waarden. Een hoge ***K*i** waarde komt overeen met een hoge DHFR activiteit, en dus een relatief lage

(geringe) inhibitie door een antifolaat. In dat geval zal de pyrimethamine analoog dus niet goed werkzaam zijn als antifolaat.

Opdracht: Zoek voor elk geteste pyrimethamine-analoog en DHFR variant (zie Tabel 1) de corresponderende ***Ki*** waarde op (zie Tabel 2) en vergelijk deze met de verkregen (theoretische) waarden voor de bindingsenergie (zie resultaten Tabel 1).

c) Blijkt uit de verkregen theoretische waarden voor de bindingsenergie dat de twee mutanten van DHFR méér resistent zijn voor pyrimethamine en de twee geteste analogen dan wildtype DHFR? Wordt dat bevestigd door de waarden van Ki uit tabel 2?

d) Wat kun je in z'n algemeenheid zeggen over het verband tussen de bindingsenergie en de waarde van Ki? Kijk hiervoor ook nog eens terug naar de informatie uit fragment 5.

Didactische tips & suggesties:

-

Functie:

- Affiniteit van pyrimethamine analogen met DHFR varianten verklaren a.d.h.v. bindingsenergieën.
- Verband tussen bindingsenergie en de waarde van Ki noemen.

Uitwerkingen activiteit 14:

a) De resultaten van deze dockings zijn wisselend: de double mutant DHFR is volgens deze docking meer resistent tegen pyrimethamine dan WT DHFR , omdat de waarde van de bindings energie minder negatief is dan bij WT DHFR. Voor de quadruple mutant geldt het andersom: hier is de bindings energie negatiever dan bij WT DHFR, dus deze zal minder resistent zijn. Voor de analogen geldt hetzelfde: sommigen hebben een negatievere bindings energie, bij anderen is de bindings energie minder negatief. Dit wordt soms bevestigd door de waarde van Ki; soms komt het wel overeen dat een lage waarde van Ki overeenkomt met een lage bindings energie, maar soms ook niet.

b) Hoe lager de bindingsenergie is, hoe lager de waarde van Ki is.

Activiteit 15: Bioisosterism als strategie voor lead optimization van pyrimethamine

Opdracht: Ontwerp ten minste één analoog dat zowel wildtype DHFR als de 2 mutanten in voldoende mate remt en beargumenteer je ontwerp. Als strategie voor het ontwerpen van een goed analoog gebruiken we 'Bioisosterism'. Lees hiervoor de achtergrond informatie over Bioisosterism in fragment 6 goed door. Ook krijg je van je docent werkbladen uitgereikt waarin de bindingssites van de verschillende varianten van DHFR in 2D weergegeven zijn. Bepaal van je eigen ontwerp ook de bindingsenergie met de DHFR varianten m.b.v. Arguslab. Verzamel de resultaten in Tabel 3.

b) Beargumenteer waarom je je eigen ontworpen analoog zo hebt gemaakt. Dus leg uit waarom je bepaalde functionele groepen hebt toegevoegd of verwijderd en wat je argumentatie daarvoor is. Maak hiervoor gebruik van de uitgereikte werkbladen waarin de bindingssites van de verschillende varianten van DHFR in 2D zijn weergegeven.

Didactische tips & suggesties:

Het is een leuke tip om de leerlingen n.a.v. deze opdrachten een wetenschappelijke poster presentatie te laten geven (zie ook tips bij activiteit 2 over het oefenen voor zo'n wetenschappelijke poster presentatie en suggesties voor beoordeling). In deze poster presentatie kunnen de leerlingen namelijk laten zien welk analoog ze zelf ontworpen hebben en *waarom* ze dit analoog zo ontworpen hebben. Zo kun je niet alleen hun argumentatie testen, maar het is ook leuk om aan hun klasgenoten te laten zien wat ze hebben ontdekt.

Functie:

- Ontwerpen van pyrimethamine analoog;
- Beargumenteren van ontwerp.

Uitwerkingen activiteit 15:

Voorbeeld argumentaties: Het plaatsen van een halogeen op plek X en Y zal vanwege z'n elektronegativiteit wellicht meer dipool-dipool interacties kunnen veroorzaken met het DHFR eiwit. Hierbij kan gedacht worden aan grote en/of kleine halogenen (dus Fluor kan bijvoorbeeld gebruikt worden als er weinig ruimte is, maar Chloor als er veel ruimte is).
Op het werkblad zie je dat er een hydrofobe interactie aanwezig is met pyrimethamine aan de kant van plek X, Y en R. Hier zouden extra hydrofobe groepen geplaatst kunnen worden (zoals methyl, ethyl, etc., ook afhankelijk van hoeveel ruimte er is) om deze hydrofobe interactie wellicht te versterken.
Een andere argumentatie zou zijn om op plek R aan de ethylgroep nog een zuurgroep of alcohol groep te plaatsen. Misschien kunnen hier dan nog makkelijker waterstofbruggen met het nabijgelegen aminozuur Asp54 gevormd worden.
Al deze voorbeeld aanpassingen kunnen ingevoerd worden in het nieuwe analoog en getest worden met Arguslab om te kijken of deze aanpassingen verbeteringen zijn of juist niet.

Hoofdstuk 6. Op weg naar een geneesmiddel

Activiteit 16: Van Drug Discovery naar Marktintroductie

In deze opdracht kijken we terug naar het proces van lead optimization dat je doorlopen hebt in deze module. Tegelijkertijd kijken we vooruit naar wat er allemaal nog meer komt kijken bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen.

e) Lees Fragment 7 en maak een blokschema waarbij het hele proces van de zoektocht naar een potentieel medicijn tot de marktintroductie wordt weergegeven. Zoek uit hoeveel tijd (gemiddeld, ruwe schatting) iedere fase kost. Waar in dit proces bevindt zich de lead finding en de lead optimization fase?

f) Wat kun je nu op basis van je eigen ervaringen als voor- en nadelen noemen over het proces van lead-optimization? Vind je lead optimization een geschikte methode om nieuwe medicijnen te ontwikkelen voor malaria?

g) Kun je iets zeggen over de voorspellende waarde van Ki en de binding van lead en target voor het vinden van een goed geneesmiddel? Kijk hiervoor nog eens terug naar je conclusies van activiteit 14 en 15.

h) Als eindniveau van deze module moet je onder andere ‘a.d.h.v. de malaria context kunnen toelichten hoe Molecular Modeling bijdraagt aan de ontwikkeling van medicijnen’. Leg dit in minimaal 150 woorden uit.

Didactische tips & suggesties:

-

Functie:

- Aangeven of lead optimization een geschikte methode is om nieuwe medicijnen te ontwikkelen voor malaria;
- Voorspellende waarde van Ki noemen.
- Functie van Molecular Modeling in de context van ‘medicijnontwikkeling voor malaria’.

Uitwerkingen activiteit 16:

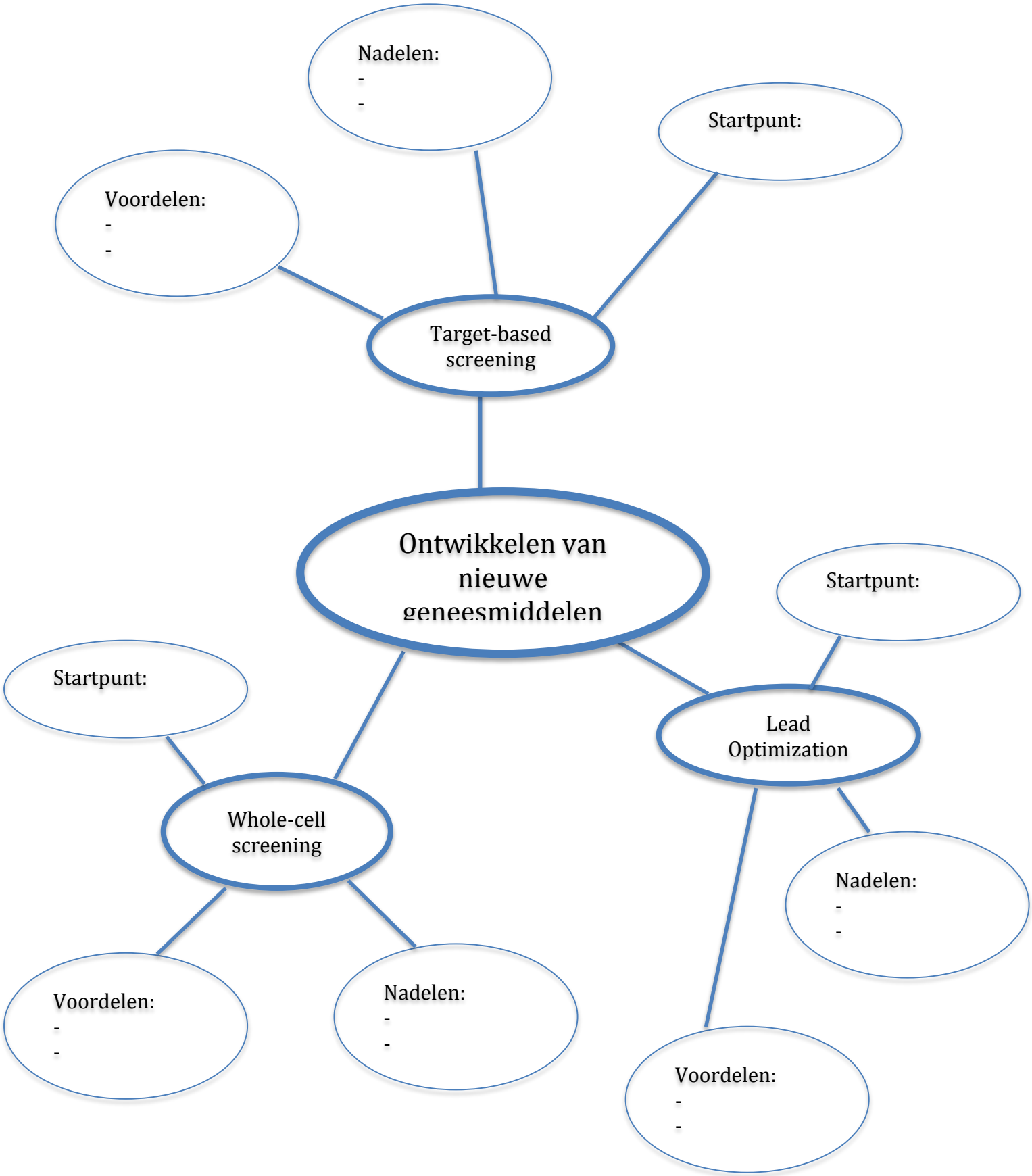
a) Zie bijlage 5.

b) Bij lead optimization is het voordeel dat je niet vanaf het begin hoeft te beginnen: zowel de lead als het target zijn al bekend, dus daar hoef je niet meer naar op zoek te gaan. Ook is het een voordeel dat je niet alles in een experiment hoeft te gaan testen, maar dat je het eerst theoretisch kunt testen met behulp van een computer programma. Alleen de beste analogen hoef je in het echt te testen. Dit scheelt een hoop tijd en geld.

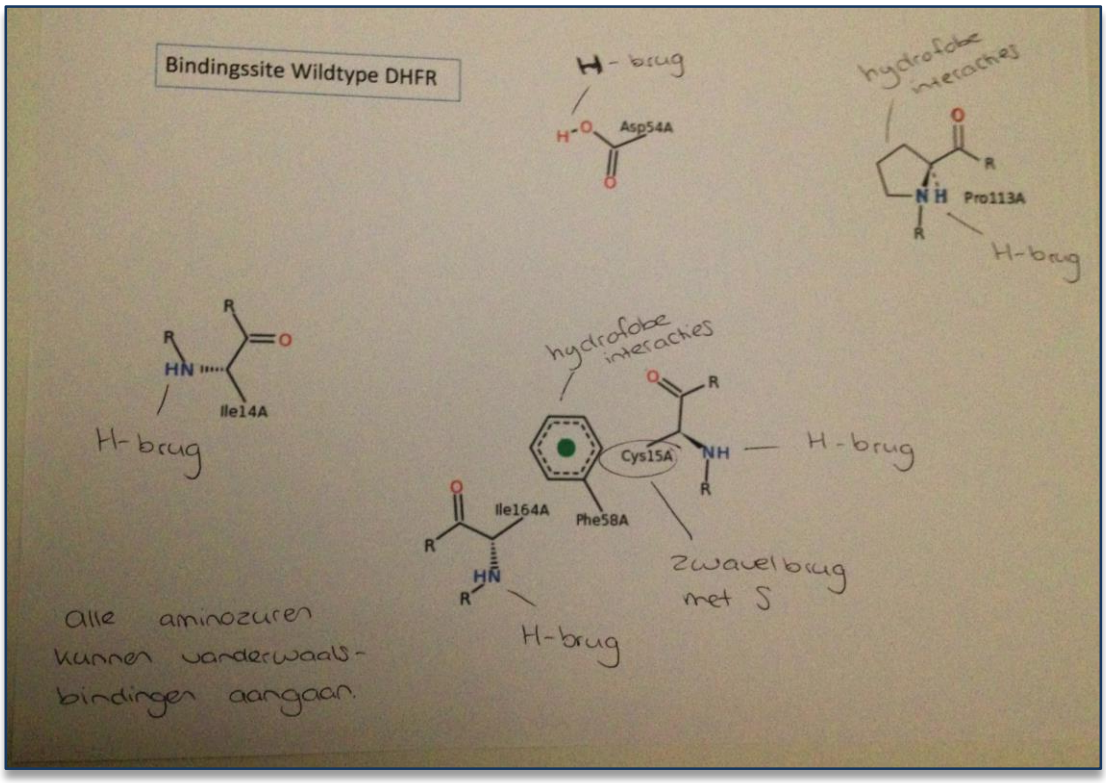
c) Als je hebt ontdekt dat er een lage waarde van Ki is, zal de bindingsenergie tussen lead en target laag zijn, en zul je dus een goed geneesmiddel hebben, omdat het goed bindt.

d) Met behulp van Molecular Modeling kun je bestaande medicijnen voor malaria gaan aanpassen, zodat deze medicijnen ook geschikt zijn voor resistente parasieten. Deze aanpassingen kun je heel gericht maken, omdat zowel de lead als het target bekend zijn. Je kunt dus met behulp van een computer programma zien welke interacties er aanwezig zijn tussen lead en target en zo ook voorspellen welke interacties je zou willen krijgen om de lead te verbeteren. Op die manier kun je eerst een aantal medicijnen theoretisch testen voordat je ze in het echt gaat testen. Want alleen de beste analogen met de meeste potentie worden in het echt getest. Dit scheelt een hoop tijd en geld. Dus op die manier draagt Molecular Modeling bij aan de ontwikkeling van nieuwe medicijnen voor malaria.

Bijlage 1 – opzet mindmap bij activiteit 4

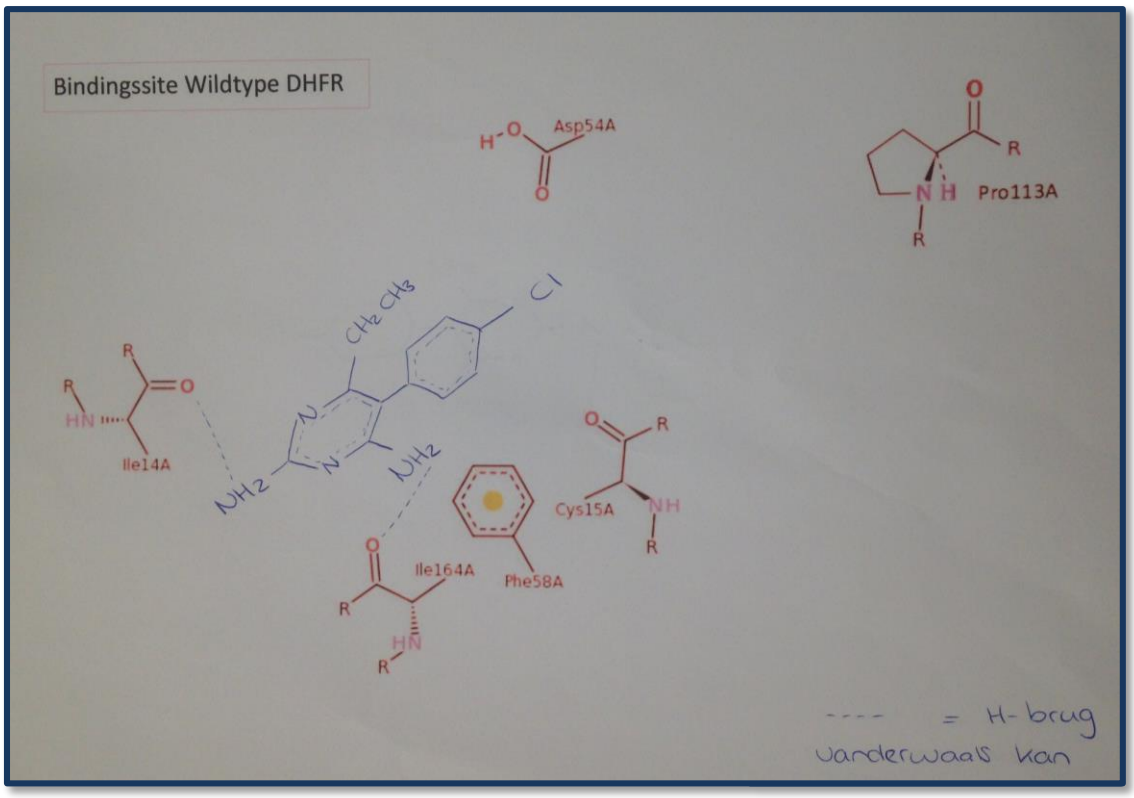


Bijlage 2 – werkblad activiteit 9

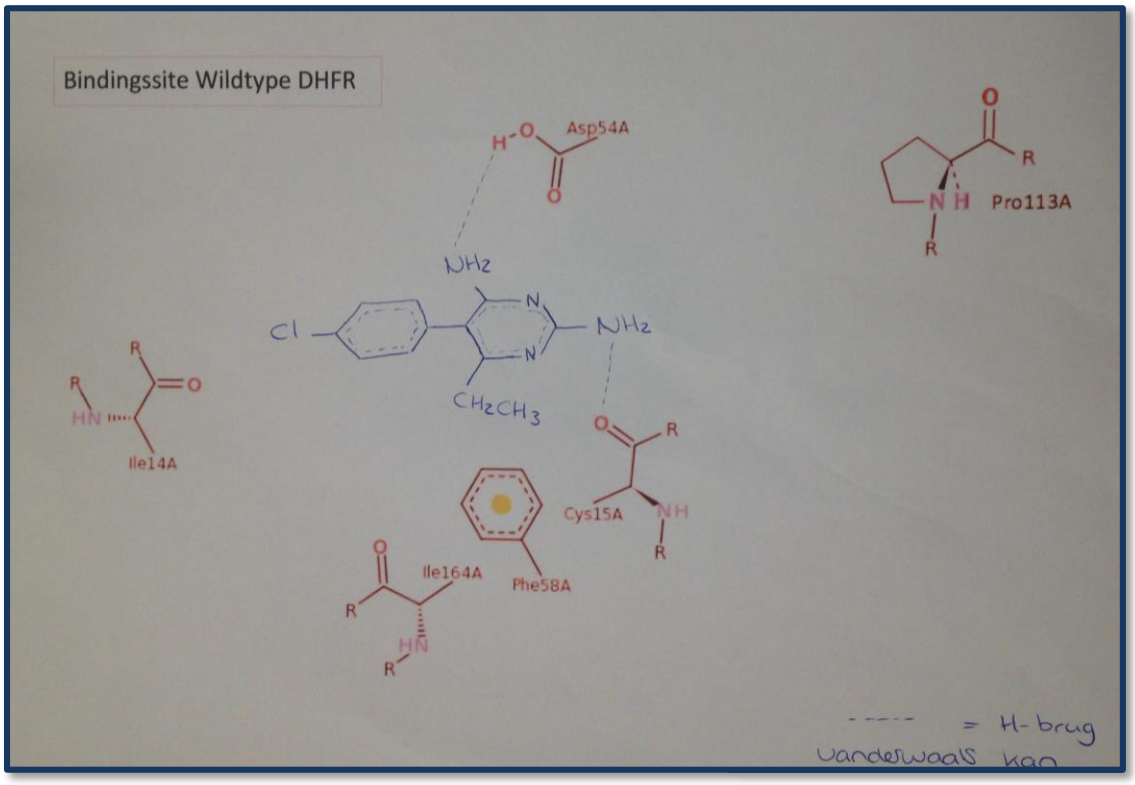


Bijlage 3 – activiteit 9

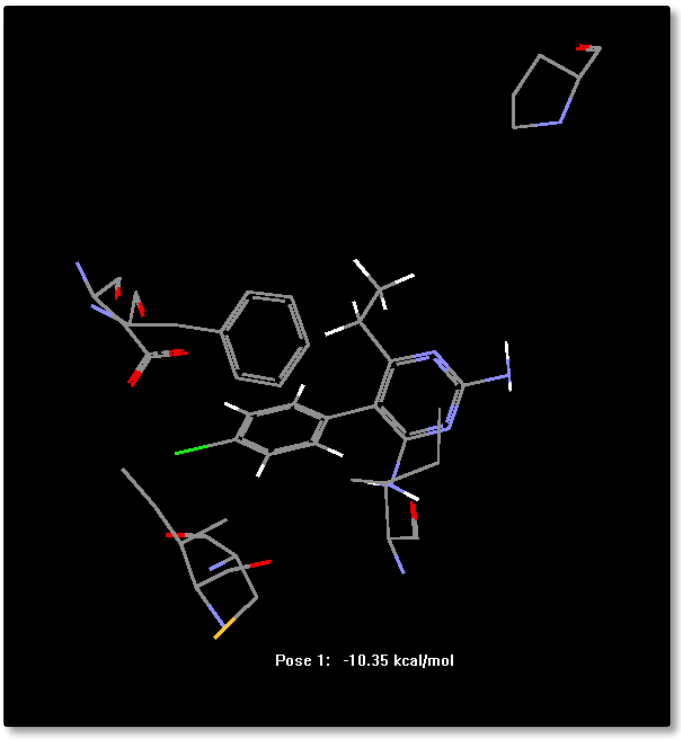
Voorbeeld 1



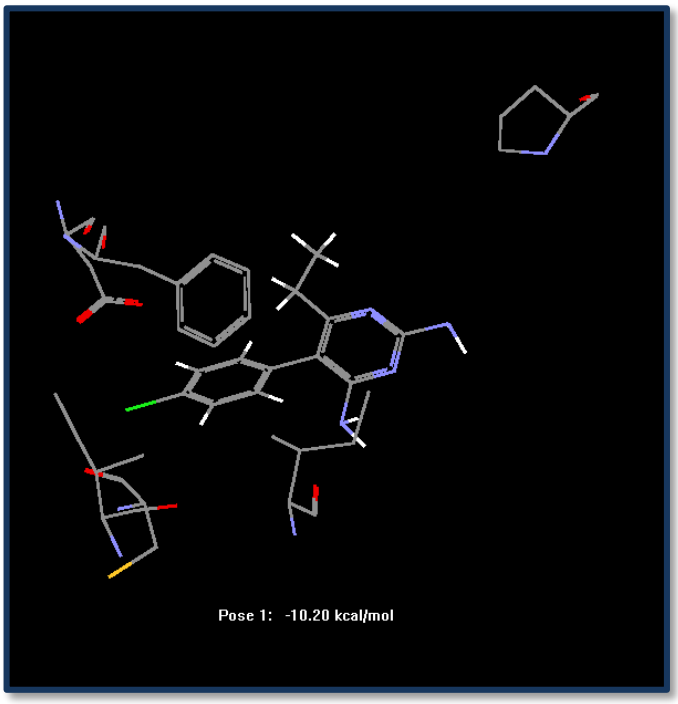
Voorbeeld 2

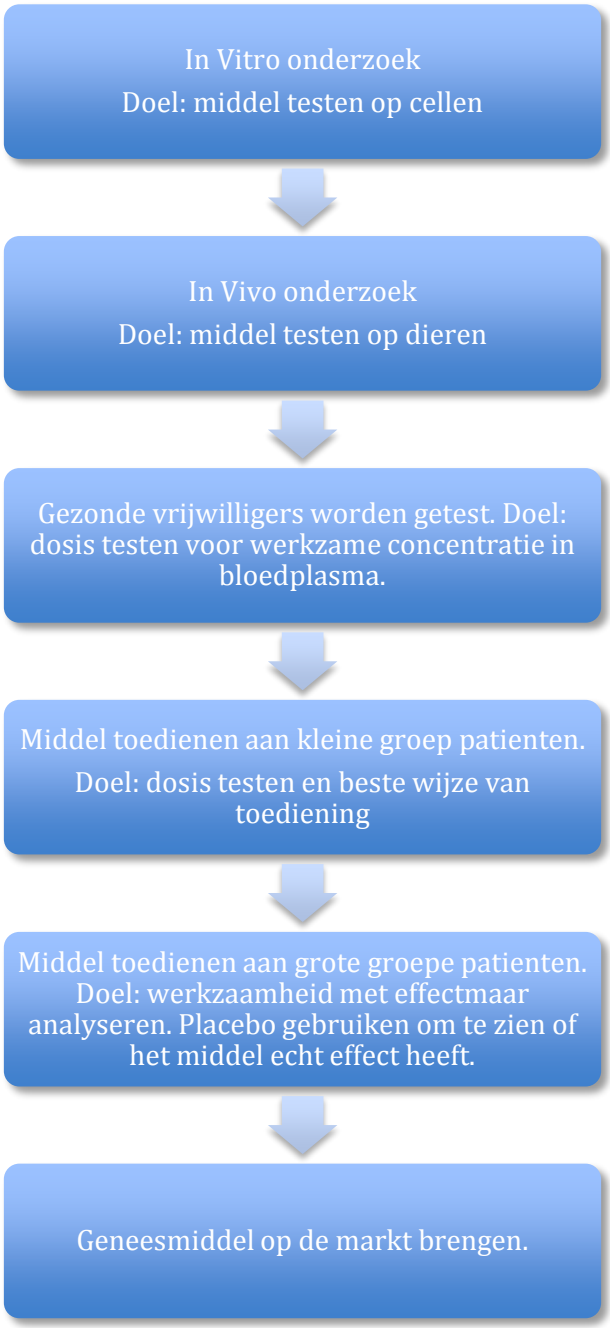


Bijlage 4 – activiteit 10



Docking pyrimethamine met WT DHFR.
Pose: -10,35 kcal/mol



Docking pyrimethamine met double mutant DHFR.
Pose: -10,20 kcal/mol

Bijlage 5 – activiteit 16