



УДК 577

© 2012

В. В. Гурмач, О. М. Балинський, П. О. Бориско, М. О. Платонов,
Г. Х. Баєнг, Д. Б. Ковальський, Ю. І. Прилуцький

Пошук низькомолекулярних лігандів для SH2-доменів методом докінгу міжмолекулярних взаємодій

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говорунгом)

Біологічні процеси в живих системах відбуваються за участі великої кількості різноманітних білкових молекул, які функціонують завдяки взаємодії одна з одною у складі стабільних або динамічних білкових комплексів. Знання просторової структури комплексів клітинних білків та мембранних рецепторів з лігандами є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів їх функціонування. У даному повідомленні запропоновано алгоритм дослідження SH2-доменів на прикладі білка STAT3 методом докінгу міжмолекулярних взаємодій, який дозволяє передбачити конформацію ліганду всередині активного центру. Це, зокрема, відкриває шлях до раціонального пошуку і дизайну нових лікарських препаратів, що володіють протипухлинною активністю.

Взаємодія між білками, нуклеїновими кислотами, вуглеводнями і ліпідами відіграє ключову роль у передачі клітинних сигналів. Крім того, орієнтація взаємодіючих структур впливає як на тип, так і на силу сигналу. Тому знання їх просторової конформації є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів функціонування біоб'єктів. Раціональний пошук і дизайн нових лікарських препаратів також потребує структурної інформації щодо їх взаємодії з білком-мішенню. Саме за допомогою комп'ютерного моделювання вдається отримати оптимальні просторові структури ліганду і білка-мішені [1]. Їх детальний аналіз дозволяє визначити основні сили, що сприяють зв'язуванню найбільш комплементарних одна до одної частин молекул.

Як відомо [2], компактний глобулярний SH2-домен взаємодіє з білками, які містять фосфорильований залишок тирозину (Tyr) [2]. Здебільшого цей домен міститься в онкобілках (Src oncoprotein) та у білках, що входять у сигнальні каскади клітини. Людський геном кодує близько 120 SH2-доменів, які відносяться до 110 білків та беруть активну участь у білок-білкових взаємодіях. Їх поширеність в організмі тварин і майже повна відсутність

у мікроорганізмах (наприклад, примітивний SH2-фрагмент у дріжджах) дозволяє зробити припущення, що поява цього домену пов'язана з ускладненням механізмів передачі сигналів у багатоклітинних організмах [3].

Білок STAT3 відноситься до групи молекулярних перемикачів [4]: регулює генну експресію у мітохондріях, впливає на активність електронно-транспортного ланцюга злоякісних пухлин [5]. Тому його інгібування може бути клінічно застосовано у терапії ракових захворювань. Наявні рентгеноструктурні дані свідчать про зв'язування STAT3 з лігандами не пептидної природи. При цьому домінуюча роль належить гетероциклічним структурам як інгібіторам цього білка. Важливо відзначити, що саме не пептидні інгібітори задовольняють вимогам стабільності фармакологічних препаратів в організмі. Гетероциклічні сполуки краще модифікуються для підвищення їх селективності та функціональної активності, зокрема вдається навіть замінити гетероциклічне ядро без втрати активності, що неможливо зробити для пептидоміметиків.

З урахуванням зазначеного вище нами був розроблений і тестований алгоритм пошуку специфічних лігандів для основної платформи SH2-доменів на прикладі SH2-вмісного білка STAT3 для створення цільової бібліотеки на SH2-домени [6–9].

Методи дослідження. Пошук лігандів для SH2-домену STAT3 здійснювали методом молекулярного докінгу. Рентгенограми структур STAT3 взято з бази даних PDB. Після їх аналізу були встановлені правила відбору низькомолекулярних лігандів. Для фільтрування комерційно доступної бази хімічних речовин компанії Enamine використовували програму JChem. За допомогою пакета Corina згенеровано всі можливі варіанти стереоізомерів. З використанням програмного пакета flo+ [10] виконано докінг. Отримані результати обробляли multyRmsd фільтрами [11]. Важливо відзначити, що у процесі розрахунків враховано, що діапазон рухливості взаємодіючих структур може бути різним, починаючи з невеликих бічних ланцюгів і закінчуючи масштабними доменними рухами [12].

Результати та їх обговорення. Спочатку білок STAT3 дослідили на прикладі простих взаємодій з метою відбору принципово важливих амінокислот для зв'язування лігандів. Для цього було розроблено п'ять моделей, які відрізнялися механізмом зв'язування (рис. 1). Проведені розрахунки виявили, що всі ліганди, які зв'язуються з SH2-доменом, були короткими — їх довжина не перевищувала довжину 2–3-х пептидних зв'язків, а для нормального зв'язування довжина повинна бути із 4–5 пептидних зв'язків. У цьому полягає принципова відмінність взаємодії субстрату і низькомолекулярного ліганду, тобто ліганд повинен на менший об'єм субстрату дати більшу кількість зв'язків. Тому попередньо нами був проведений детальний аналіз поверхні зв'язування білка і на його основі сформульовано унікальні правила зв'язування у кожній з п'яти запропонованих моделей. Наведені на рис. 1 результати для перших чотирьох моделей є наслідком того, що п'ята модель вирізнялася досить широкими енергетичними межами щодо утворення можливих структурних конформацій, завдяки чому в ній відтворювалися всі взаємодії, що характерні для попередніх моделей.

Перша та четверта моделі принципово відрізняються за механізмом зв'язування з амінокислотним оточенням, але і їм притаманні спільні риси. Так, в обох випадках ліганд щільно заповнює сайт зв'язування фосфотирозину, утворюючи міцні водневі зв'язки: у першому випадку з Lys 591 та Arg 609, а в другому — з Arg 609. Ліганди в обох моделях стерично взаємодіють з багатьма амінокислотами за принципом розпізнавання ароматичного залишку, до яких входять Glu 612, Val 637, Pro 639, Ser 613 й 611.

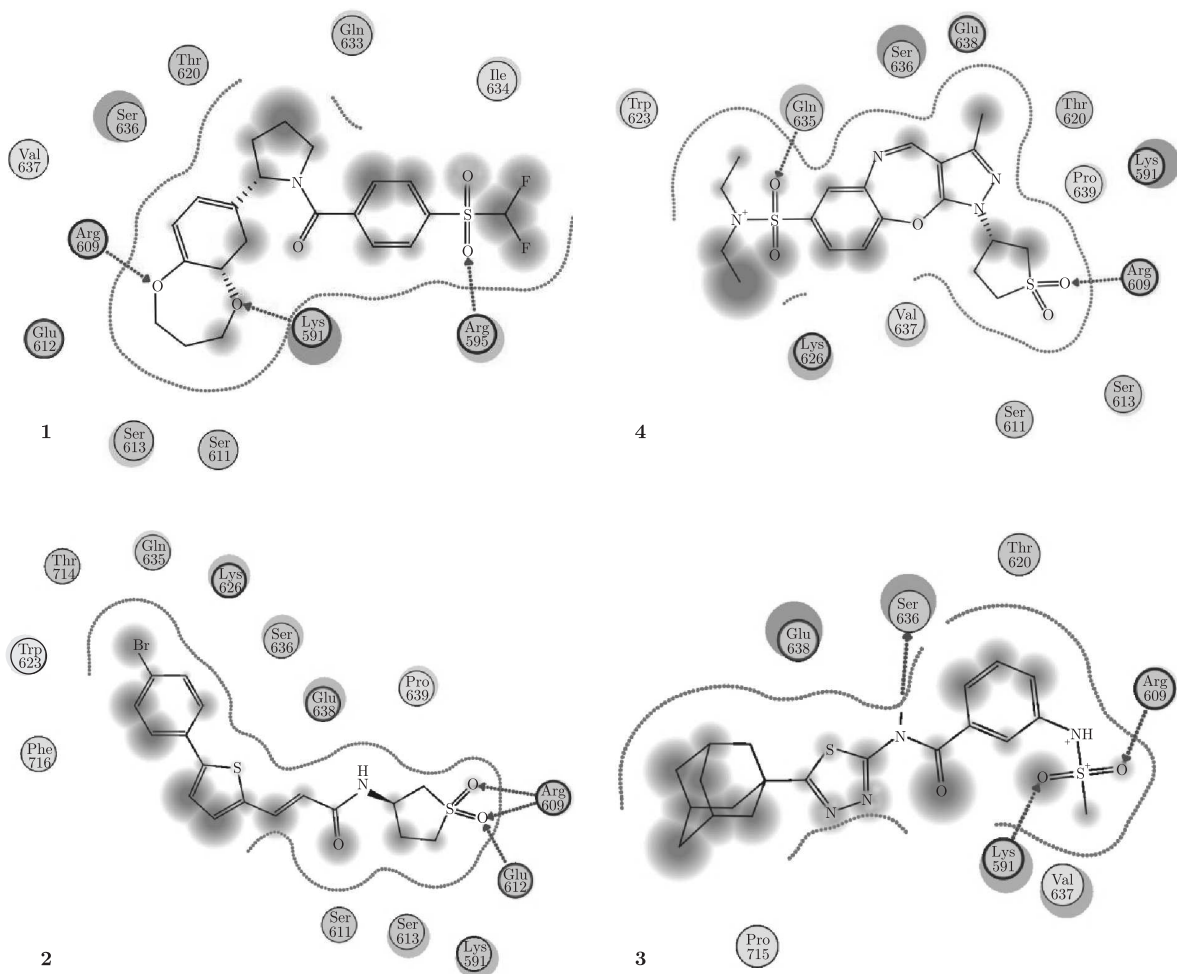


Рис. 1. Розрахункові моделі **1** і **4**, **2** і **3** STAT3 білка (схематичне зображення кишені зв'язування з лігандом)

Перша модель передбачає утворення другого кластеру водневих зв'язків, утворених з Arg 595, який просторово наближений до фосфотирозинового субпакета і має різне функціональне наповнення з точки зору механізму роботи ферменту. Ліганди четвертої моделі заповнюють основний простір кишені при зв'язуванні з 1 або 2 фосфотирозиновим залишком Gln 635 водневим зв'язком. Також, зважаючи на гнучкість лізинового залишку (Lys 626), можливе утворення водневого зв'язку між ним і лігандом. Варто зазначити, що для першої моделі характерні просторово і стерично жорсткі молекули з невеликим об'ємом. На противагу їй у четвертій моделі присутні сполуки з ароматичним каркасом, які можуть бути достатньо гнучкими.

Друга і третя моделі мають однаковий механізм зв'язування з фосфотирозиновим сайтом і демонструють гнучкість у підборі низькомолекулярних структур. Саме цей сайт є ключовим щодо здатності речовин інгібувати мішень. Проте існують інші функціональні групи, які за хімічною будовою та просторовою структурою відрізняються від нього. Так, у другій моделі — це циклосольфановий фрагмент, а також аліфатичний і конформаційно-гнучкий цикл. У третій моделі — це арилсульфамідна група, яка стерично імітує фосфотирозиновий фрагмент. У рамках моделі **2** сполуки заповнюють кишеню, утворену

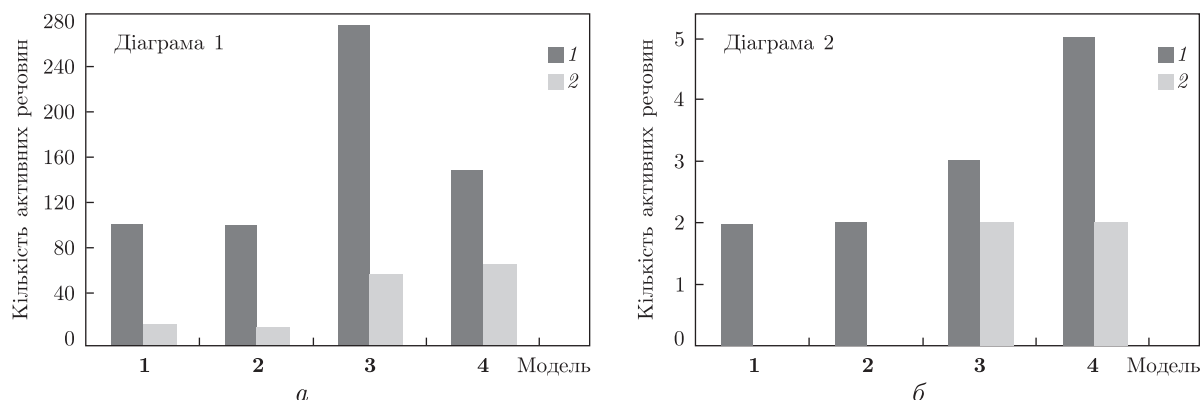


Рис. 2. Порівняння теоретичних даних інгібування (діаграма 1) з експериментальними біологічними даними (діаграма 2) [13].

Умовні позначення: N (1), O (2) — хімічні елементи, за якими відбувалося фільтрування потенційних лігандів у кишені зв'язування

Phe 716, Trp 623, Thr 714 та Lys 626. Ці амінокислотні залишки відносяться до різних структурних фрагментів, але просторово наближені один до одного. Для стабільної взаємодії необхідна конформаційна жорсткість, яка досягається за рахунок спряження складної системи гетероциклів, і домінування в кишені стекінг та катіон- π -взаємодій. У третій моделі відбуваються взаємодії, що подібні до зв'язування субстрату. Це єдина схема інгібування, при якій ліганд досягає Pro 715, тобто заповнює об'єм і реалізує контакти з оточенням подібно субстрату. Також важливим є утворення водневого зв'язку з Ser 636, який імітує субстрат.

Проаналізувавши поверхню сайтів зв'язування для перелічених вище моделей, було запропоновано оригінальні правила аналізу для кожної з них. Далі розроблені правила відбору речовин було взято з баз даних Enamine (1,7 млн речовин), які потенційно можуть виступати лігандами SH2-домену STAT3 за такими параметрами (в межах (min/max) значень): розчинність у воді (-6,5-(-3)), величина, що вказує на ліпофільність або гідрофільність речовини (тобто за цим параметром можна судити, як речовина проходить крізь плазматичну мембрану: 1-5,25), акцептори водню (4-12), обертальні зв'язки (3-9) та молекулярна вага (280-480). З використанням розрахункової програми Corina згенерували стереоізомери цих речовин і отримали понад п'ятсот тисяч речовин, які у подальшому використали для молекулярного докінгу.

Як видно з діаграми 1 (рис. 2), після фільтрування залишилося трохи більше тисячі потенційних лігандів SH2-домену. При цьому найбільш активними були ті ліганди, які зв'язувалися з атомами кисню (див. рис. 1). З діаграми 1 випливає, що найбільш вдалою є третя модель, де спостерігається найбільша кількість потенційно активних лігандів. Це може бути пов'язано з тим, що Pro 715 значно виступає над кишенею зв'язування, завдяки чому ліганд практично в усіх випадках змушений зв'язуватися всередині кишені і відповідно закривати її поверхню.

Діаграма 2 (див. рис. 2) демонструє результати біологічного скринінгу понад ста лігандів [13]. Тестування проводили на лінії клітин L540 впродовж 24 год з кожним лігандом за концентрації 30 мкмоль. Теоретичні розрахунки відрізняються від цих даних, оскільки в експерименті найбільш активними виявились ліганди, що отримані в рамках четвертої, а не третьої (як у нашому випадку) моделі. Проте слід зазначити, що всі чотири теоре-

тичні моделі враховують активні сполуки, які значно відрізняються за механізмом зв'язування з амінокислотним оточенням. Тому наразі першочерговим завданням є застосування розробленої методики для цілеспрямованого відбору низькомолекулярних лігандів на всю платформу SH2-доменів. Також перспективним є її використання для роботи з конформаційно-рухливими мішенями, такими, як HIV TAT [14]. У цьому випадку алгоритм розбиття поверхні кишені на принципово різні моделі зв'язування дозволить уникнути втрат лігандів, які взаємодіють за нестандартними механізмами, та отримати важливу інформацію щодо можливості адаптації кишені для зв'язування з лігандом.

1. *Lengauer T., Rarey M.* Computational methods for biomolecular docking // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1996. – **6**. – P. 402–406.
2. *Гурмач В.В., Балінський О.М., Платонов М.О. та ін.* Метод молекулярного докінгу за участю SH2-доменів як важливих елементів внутрішньоклітинного функціонування // *Біотехнологія.* – 2012. – **5**. – С. 31–40.
3. *Stelzl U., Worm U., Lalowski M. et al.* A human protein-protein interaction network // *Cell.* – 2005. – **122**. – P. 957–968.
4. *Konnikova L., Simeone M. C., Kruger M. M. et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells // *Cancer Res.* – 2005. – **65**. – P. 6516–6520.
5. *Akira S., Nishio Y., Inoue M. et al.* Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway // *Cell.* – 1994. – **77**. – P. 63–71.
6. *Bursulaya B. D., Totrov M., Abagyan R., Brooks C. L.* Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking // *Comput. Aided Mol. Des.* – 2003. – **17**. – P. 755–763.
7. *Schulz-Gasch T., Stahl M.* Binding site characteristics in structure-based virtual screening: evaluation of current docking tools // *J. Mol. Model.* – 2003. – **9**. – P. 47–57.
8. *Ferrara P., Gohlke H., Price D. J. et al.* Assessing scoring functions for protein-ligand interactions // *J. Med. Chem.* – 2004. – **47**. – P. 3032–3047.
9. *Park I. H., Li C.* Characterization of molecular recognition of STAT3 SH2 domain inhibitors through molecular simulation // *J. Mol. Recognit.* – 2011. – **2**. – P. 54–65.
10. *Gregory L. W., Millard H. L., Simon F. S. et al.* A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions // *J. Med. Chem.* – 2006. – **49**. – P. 5912–5931.
11. *Diederichs K.* Structural superposition of proteins with unknown alignment and detection of topological similarity using a six-dimensional search algorithm. *Proteins* // *J. Proteins.* – 1995. – **23**. – P. 95–187.
12. *Betts M. J., Sternberg M. J.* An analysis of conformational changes on protein-protein association: implications for predictive docking // *Protein Eng.* – 1999. – **12**. – P. 271–283.
13. *Kim B. H., Min Y. S., Baeng G. H.* Benzoxathiol derivative BOT – 4-one suppresses L540 lymphoma cell survival and proliferation via inhibition of JAK3/STAT3 signaling // *Exp. Mol. Med.* – 2011. – **43**. – P. 313–321.
14. *Gehlhaar D., Verkhiver G., Reijto P. et al.* Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming // *Chem. Biol.* – 1995. – **2**. – P. 317–324.

В. В. Гурмач, О. М. Балинский, П. А. Бориско, М. О. Платонов,
Г. Х. Баенг, Д. Б. Ковальский, Ю. И. Прилуцкий

Поиск низкомолекулярных лигандов для SH2-доменов методом докинга межмолекулярных взаимодействий

Биологические процессы в живых системах происходят с участием большого количества различных белковых молекул, которые функционируют благодаря взаимодействию друг с другом в составе стабильных или динамических белковых комплексов. Знание пространственной структуры комплексов клеточных белков и мембранных рецепторов с лигандами является важным шагом на пути к пониманию механизмов их функционирования. В данном сообщении предложен алгоритм исследования SH2-доменов на примере белка STAT3 методом докинга межмолекулярных взаимодействий, который позволяет предсказать конформацию лиганда внутри активного центра. Это, в частности, открывает путь к рациональному поиску и дизайну новых лекарственных препаратов, обладающих противоопухолевой активностью.

V. V. Hurmach, A. M. Balynskiy, P. O. Borysko, M. O. Platonov,
G. H. Baeng, D. B. Kovalsky, Yu. I. Prylutsky

Search for low-molecular ligands for SH2-domains by the docking method of intermolecular interactions

Biological processes occurring in living systems involve a large number of different protein molecules that function through the interaction with one another in the composition of stable and dynamic protein complexes. Knowledge of the spatial structure of cellular protein systems and membrane receptors with ligands is an important step toward understanding the mechanisms of their functioning. We propose an algorithm for studying the SH2-domains, for instance, STAT3 protein by the docking method of intermolecular interactions, which allows one to predict the conformation of a ligand within the active site. In particular, it opens a way to the rational search for and the design of new pharmaceutical drugs that have an antitumor activity.