

СТРУКТУРНО-ОПОСРЕДОВАННЫЙ ПОИСК ИНГИБИТОРОВ ОТКРЫТОЙ КОНФОРМАЦИИ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Смолкина Э.В.^{1,2}, Поленова А. М.^{1,2}, Нилов Д.К.²

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины, г. Москва

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, г. Москва

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа, ингибитор, компьютерный скрининг, опухолевые заболевания.

Резюме: в данном исследовании были построены молекулярные модели открытой формы ЛДГ, предназначенные для компьютерного скрининга ингибиторов, а также определены структурные критерии отбора наиболее перспективных соединений.

Resume: full-atom models of human lactate dehydrogenase A in the open confirmation have been generated to enable further computer screening of novel inhibitors. The structural criteria for the selection of the most promising inhibitors were established.

Актуальность. Лактатдегидрогеназа А (ЛДГ-А) играет существенную роль в энергетическом обмене раковых клеток [4] и является перспективной мишенью для разработки противоопухолевых химиопрепаратов [1]. Было показано, что при переходе ЛДГ-А в открытую форму за счет движения петли 96-111 образуется дополнительный участок связывания [2]. Расположенный на данном участке потенциальный ингибитор препятствует связыванию субстрата пирувата, но при этом не влияет на связывание кофермента НАДН [5]. Это может быть важно для дизайна селективных ингибиторов ЛДГ-А, не оказывающих влияние на другие НАДН-зависимые ферменты.

Цель: поиск ингибиторов открытой конформации лактатдегидрогеназы А человека.

Задачи: 1. Сконструировать молекулярные модели открытой формы ЛДГ-А для компьютерного поиска селективных ингибиторов. 2. Выявить аминокислотные остатки активного центра, необходимые для поиска потенциального ингибитора открытой формы ЛДГ-А.

Материал и методы. Анализ всех существующих на данный момент кристаллических структур открытой формы ЛДГ-А, апоформы и двойного комплекса ЛДГ-А с НАДН проводился с помощью программы Swiss-PdbViewer 4.1.0 [6]. Построение моделей ЛДГ-А было осуществлено на основе pdb-структуры 4l4s: протонирование структуры фермента осуществлялось в программе AmberTools 15, дальнейшая оптимизация координат проводилась с помощью Amber 14[7]. Докинг известных лигандов ЛДГ-А в активные центры субъединиц А и В производился с помощью программы Lead Finder в режиме extra precision [8,9]. Отбор сульфозамещенных соединений из доступной библиотеки ZINC проводился с помощью ACD Labs/Spectrus DB. Фильтрация с использованием структурных критериев проводилась с помощью vsFilt [3].

Результаты и их обсуждение. В данной работе были построены молекулярные модели открытой формы ЛДГ, предназначенные для компьютерного скрининга ингибиторов, а также определены структурные критерии отбора наиболее перспективных соединений. При наложении кристаллических структур открытой формы ЛДГ-А обнаружено, что большинство остатков активного центра отличаются высокой конформационной подвижностью, однако положение боковых цепей Arg168 и His192, которые играют ключевую роль в связывании субстратов и ингибиторов, достаточно жестко зафиксировано. Боковая цепь еще одного остатка, Thr247, может находиться в двух стабильных конформациях, отличающихся поворотом на 180° (рисунок 1). Эти три остатка сгруппированы в одной области активного центра и формируют участок, подходящий для эффективного связывания полярных функциональных групп. На основе кристаллической структуры 4l4s были сконструированы модели ЛДГ-А, в одной из которых His192 положительно заряжен, а в другой - находится в нейтральной форме (его рКа 7,3 обуславливает возможность различных ионизационных состояний). Для остатка Thr247 была выбрана та конформация, в которой его боковая цепь способна образовать водородную связь с потенциальным ингибитором. К структуре белка добавили атомы водорода, и затем их координаты были оптимизированы. Докинг известных лигандов ЛДГ-А в активные центры субъединиц А и В выявил водородные связи между отрицательно заряженной группой лиганда и остатками Arg168, His192 и Thr247, которые можно использовать в качестве структурных критериев при скрининге и отборе новых ингибиторов ЛДГ-А. Сульфогруппа представляет собой изостерический аналог карбоксильной группы молекулы пирувата. Тестовый компьютерный скрининг сульфозамещенных соединений, извлеченных из библиотеки ZINC, продемонстрировал эффективность такого подхода (рисунок 2). Использование предложенных структурных критериев позволяет отбраковать более 95% соединений и отобрать молекулы с наиболее выгодными водородными связями между сульфогруппой и активным центром ЛДГ-А.

Выводы: на основе структуры 4l4s были построены различные молекулярные модели белка. Для валидации моделей несколько известных ингибиторов были успешно были докированы в активные центры фермента. Определены аминокислотные остатки с устойчивой конформацией, важные для связывания потенциальных ингибиторов с открытой формой ЛДГ-А: Arg168, His192, Thr247. Данные структурные критерии позволяют эффективно отбирать ограниченное число молекул, потенциально эффективных ингибиторов фермента.

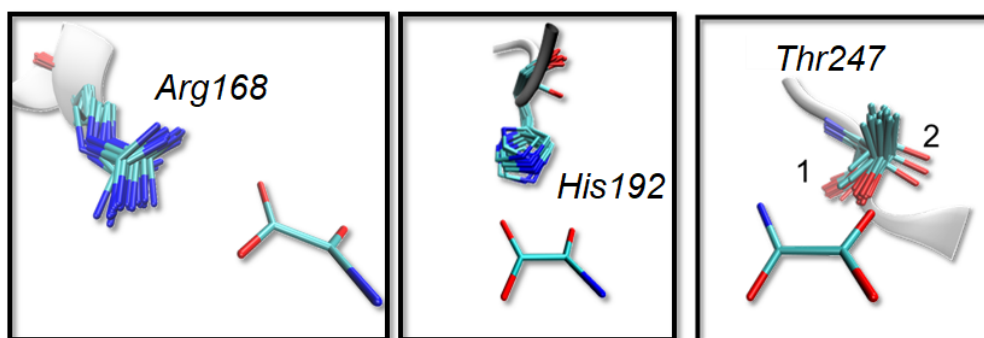


Рис. 1 – Структурный анализ остатков, важных для связывания ингибитора

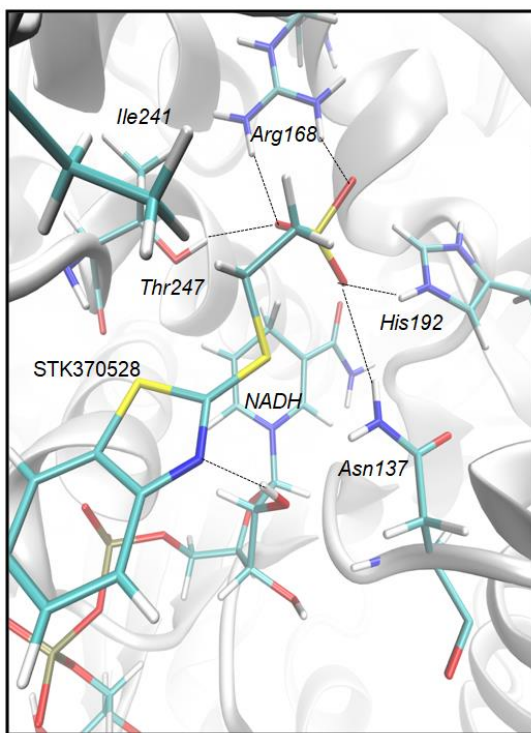


Рис. 2 – Смоделированная позиция сульфозамещенного ингибитора STK370528

Литература

1. Hamaana R. B., Chandel N. S. Targeting glucose metabolism for cancer therapy // *Journal of Experimental Medicine*. – 2012. – Т. 209. – №. 2. – С. 211-215.
2. Нилов Д.К., Прохорова Е.А., Швядас В.К. Поиск ингибиторов лактатдегидрогеназы А человека с использованием компьютерного моделирования // *Acta Naturae (русскаяязычная версия)* – 2015. – Т. 7, №2(25). – С. 62-68.
3. Gushchina I., Svedas V., Nilov D. Selection of bifunctional tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors through molecular modeling // *FEBS OPEN BIO*. –2018. – Т. 8. – С. 455-455
4. Warburg [et al.] On respiratory impairment in cancer cells // *Science*. – 1956. – Т. 124. – №. 3215. – С. 267-272.
5. Read J.A. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase // *Proteins*— 2001 — Т. 43. №. 2. – С. 175-185.
6. Guex, N., Peitsch, M. C., Schwede, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. // *Electrophoresis* – 2009. – Т. 30, №1, – С. 162-173.
7. Hornak V. et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2006. – Т. 65. – №. 3. – С. 712-725.
8. Novikov F. N. [et al.] Lead Finder docking and virtual screening evaluation with Astex and DUD test sets // *Journal of computer-aided molecular design*. – 2012. – Т. 26. – №. 6. – С. 725-735.
9. Stroganov O. V. [et al.] Lead finder: an approach to improve accuracy of protein– ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2008. – Т. 48. – №. 12. – С. 2371-2385.
10. Irwin J. J., Shoichet B. K. ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening // *Journal of chemical information and modeling*. – 2005. – Т. 45. – №. 1. – С. 177-182.