

# МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РАСПОЗНАВАНИЯ ПОЛИСИАЛОВОЙ КИСЛОТЫ И ГАНГЛИОЗИДА GD2 РЕЦЕПТОРОМ SIGLEC-8: РОЛЬ БИДЕНТАТНОГО ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОГО ЗАХВАТА

*Борисов В. Б., Дятко Г. П.*

*Научный руководитель: канд. хим. наук, доц. Лахвич Ф. Ф.*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** На основе структурного анализа *in silico* расшифрован молекулярный механизм взаимодействия рецептора Siglec-8 с высокоаффинными опухолевыми лигандами. Установлено, что высокая стабильность комплекса Siglec-8/PSA ( $\Delta G < -9$  ккал/моль) обеспечивается синергетическим эффектом «бидентатного электростатического захвата»: гибкая цепь PSA одновременно формирует два солевых мостика с остатками Arg109 и Arg56. В то же время, связывание ганглиозида GD2 ограничено его жесткой стерической структурой, допускающей лишь монодентатное «якорное» взаимодействие с Arg109, что объясняет разницу в энергиях связывания. Работа впервые представляет структурное обоснование оси PSA/GD2–Siglec-8 как мощного механизма ингибирования иммунного ответа и валидирует её в качестве перспективной терапевтической мишени.

**Ключевые слова:** раковые клетки, Siglec-8, GD2, PSA, структурный анализ, бидентатный захват, солевые мостики, конформационная жесткость, полисиаловая кислота, иммуносупрессия.

**Актуальность.** Опубликованные нами ранее результаты *in silico* скрининга позволили идентифицировать рецептор Siglec-8 как ключевую мишень, проявляющую аномально высокую и селективную аффинность к гиперсиалированным паттернам опухолевых клеток, в частности к полисиаловой кислоте и ганглиозиду GD2. Тем не менее, установленный термодинамический факт образования стабильных комплексов сам по себе не раскрывает молекулярной природы этого взаимодействия и не объясняет, каким образом рецептор преодолевает энтропийные барьеры при связывании конформационно подвижных полимерных лигандов.

Критически важным представ-

ляется выявление структурных детерминант, позволяющих активному центру рецептора реализовывать уникальный режим распознавания, отличный от классических моделей взаимодействия сиаловых кислот с другими белками семейства Siglec.

Особый интерес представляет сравнительный анализ поведения гибкой цепи полисиаловой кислоты и жесткого каркаса ганглиозида GD2 в сайте связывания, так как именно архитектурные особенности лиганда, как предполагается, определяют вариабельность энергий связывания и биологический исход контакта. Глубокое понимание топологии активного центра, включая роль ключевых аргининовых остатков и механику

электростатического захвата, является необходимым условием для перехода от фундаментального описания феномена к прикладным задачам рационального дизайна ингибиторов, способных прерывать данную иммуносупрессивную ось в микроокружении опухоли.

**Цель:** выявить атомно-молекулярные детерминанты высокоаффинного распознавания опухоль-ассоциированных гликанов (PSA, GD2) рецептором Siglec-8 и обосновать структурный механизм «бидентатного электростатического захвата» как ключевого фактора стабилизации иммуносупрессивных комплексов.

#### **Задачи:**

1. Провести детальный структурный анализ лидерных поз докинга для комплексов Siglec-8/PSA и Siglec-8/GD2.

2. Охарактеризовать роль ключевых аминокислотных остатков (Arg109, Arg56, Tyr7) в формировании солевых мостиков и водородных связей.

3. Определить влияние конформационной гибкости лиганда на энергию связывания, сравнив механизмы захвата гибкой цепи PSA и жесткой структуры GD2.

4. Обосновать модель «бидентатного электростатического захвата» как уникального механизма сверхстабильности комплекса Siglec-8/PSA.

**Материалы и методы.** Для детального структурного анализа были отобраны высокоаффинные лиганды, идентифицированные на этапе первичного скрининга: полисиаловая кислота (PSA) и дисиаialogанглиозид (GD2). Учитывая высокую

конформационную гибкость данных соединений и отсутствие их репрезентативных структур в свободном состоянии в экспериментальных базах данных, построение трехмерных моделей проводилось *de novo*. Генерация структур выполнялась с использованием специализированного веб-сервера GLYCAM-Web Carbohydrate Builder. Для обеспечения физико-химической достоверности моделей использовалась параметризация силового поля GLYCAM06, разработанная специально для точного моделирования углеводов и гликоконъюгатов [1]. Топология гликанов соответствовала каноническим последовательностям: PSA моделировалась как олигомер  $[\text{Neu5Ac}(\alpha 2-8)\text{Neu5Ac}]_n$ , GD2 – как  $[\text{Neu5Ac}(\alpha 2-8)\text{Neu5Ac}(\alpha 2-3)\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc-Ceramide}]$ .

В качестве мишени использовалась трехмерная структура лектинового домена рецептора Siglec-8. Координаты атомов белка были получены из всемирного банка данных Protein Data Bank (PDB) [2]. Для расчетов использовалась кристаллическая структура (PDB ID: 2N7A/4Q20), обладающая высоким разрешением. Перед проведением анализа структура была подвергнута процедуре очистки: удаление молекул воды, ионов и кокристаллизованных лигандов, добавление полярных атомов водорода и присвоение парциальных зарядов.

Моделирование взаимодействия проводилось с использованием программного обеспечения AutoDock GPU (версия 1.2.0). Для обеспечения статистической достоверности и воспроизводимости результатов конформационного поиска, для каждой пары

«рецептор-лиганд» было выполнено 10 независимых запусков (runs). Алгоритм поиска (Lamarckian Genetic Algorithm) был настроен на генерацию 500 прогонов (поз) в рамках каждого запуска. Это позволило создать обширную выборку конформаций для последующего анализа и исключить случайные локальные минимумы.

Отбор лидерных комплексов для механистического анализа производился на основе термодинамического критерия (минимальная энергия Гиббса связывания,  $\Delta G$ ) и критерия биоправдоподобия контактов. Детальная визуализация и анализ молекулярных взаимодействий выполнялись в программной среде PyMOL.

Оценка природы связывания включала следующие метрики:

Идентификация солевых мостиков проводилась при наличии противоположно заряженных групп на расстоянии 2.8–3.0 Å (например, между карбоксилатной группой Neu5Ac и гуанидиниевой группой аргинина).

Анализировались донорно-акцепторные пары с оптимальной геометрией.

Для сравнения механизмов связывания проводилось

пространственное наложение (суперпозиция) докинг-поз PSA и GD2 в активном центре рецептора.

Оценка конформационной жесткости проводилась путем сравнения торсионных углов гликозидных связей ( $\alpha 2-8$ ) и их способности адаптироваться к топологии связывающего кармана.

**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе структурного анализа была проведена оценка энергетического ландшафта комплексов. Установлено, что рецептор Siglec-8 демонстрирует высокую селективность по отношению к сиалированным лигандам, однако разброс энергий связывания ( $\Delta G$ ) указывает на критическую роль конформации лиганда. Лидером скрининга стала полисиаловая кислота (PSA) с энергией связывания -9.68 ккал/моль, за которой следует дисиалоганглиозид GD2 (-7.26 ккал/моль). Существенная разница ( $\Delta G \approx 2.4$  ккал/моль) между двумя лигандами, несущими схожие терминальные сиаловые остатки, потребовала детальной декомпозиции вклада отдельных аминокислотных остатков в процесс распознавания.

**Табл. 1.** Ранжирование по энергии связывания

<i>dG kcal/mol</i>	<i>Pose rank</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ligand</i>	<i>dG kcal/mol</i>	<i>Pose rank</i>	<i>Receptor</i>	<i>Ligand</i>
-9.68	5	Siglec 8	PSA	-7.26	16	Siglec 8	GD2
-9.68	14	Siglec 8	PSA	-7.14	9	Siglec 8	GD2
-7.81	5	Siglec 8	PSA	-7.14	18	Siglec 8	GD2
-7.81	14	Siglec 8	PSA	-7.14	7	Siglec 8	PSA
-7.26	7	Siglec 8	GD2	-7.14	16	Siglec 8	PSA

Анализ лидерной докинг-позы комплекса Siglec-8 с фрагментом полисиаловой кислоты выявил

уникальный супрамолекулярный механизм стабилизации, который мы определили как «бидентатный

электростатический захват». Данный механизм реализуется через взаимодействие двух пространственно разнесенных сайтов связывающего кармана (Site 1 и Site 2) с гибкой полимерной цепью лиганда.

Первичный якорный контакт (Site 1) – Каноническое распознавание терминального остатка Neu5Ac происходит посредством формирования прочного солевого мостика. Отрицательно заряженная карбоксилатная группа ( $-\text{COO}^-$ ) сиаловой кислоты координируется положительно заряженной гуанидиниевой группой боковой цепи Arg109. Измеренное расстояние между атомами кислорода карбоксилата и атомами азота аргинина составляет 2.8–3.0 Å, что соответствует идеальной геометрии ионного взаимодействия. Дополнительная фиксация пиримидинового кольца в сайте 1 обеспечивается сетью водородных связей: амидная группа N-ацетильного фрагмента выступает донором протона для карбонильного кислорода основной цепи Ser118, а гидроксильная группа глицеринового хвоста (при C8) образует связь с Gln122.

Вторичный «зажимающий» контакт (Site 2) – Ключевой особенностью Siglec-8, отличающей его от других членов семейства, является наличие второго положительно заряженного центра, сформированного остатком Arg56. Высокая конформационная гибкость  $\alpha 2-8$  гликозидной связи в PSA позволяет полимерной цепи изогнуться таким образом, что карбоксилатная группа второго (субтерминального) остатка сиаловой кислоты достигает Arg56, образуя второй независимый солевой мостик.

Стабильность ионных пар усиливается гидрофобным эффектом. Глицерольный хвост (атомы C7-C9) и метильная группа ацетамидного фрагмента терминальной сиаловой кислоты погружаются в неглубокую гидрофобную впадину, сформированную ароматическим кольцом Tyr7. Эти гидрофобные контакты и сопутствующие им СН-π взаимодействия выполняют две функции: во-первых, они вносят дополнительный вклад в общую энергию связывания (гидрофобный эффект); во-вторых, что более важно, они экранируют первичный солевой мостик Arg109-Neu5Ac от молекул воды (растворителя). Такое экранирование предотвращает ослабление ионной связи диэлектрической проницаемостью воды, делая ее значительно прочнее.

Дисиалоганглиозид GD2, характерный маркер опухолей нейроэктодермального происхождения, был идентифицирован как второй по значимости лиганд для Siglec-8. Расчетное значение  $\Delta G = -7.26$  ккал/моль указывает на формирование высокостабильного комплекса, аффинность которого сопоставима с экспериментально измеренной для канонических сульфатированных лигандов Siglec-8. Анализ наилучшей докинговой позы показывает, что, в отличие от гибкой PSA, распознавание GD2 в значительной степени определяется его предопределенной, более жесткой трехмерной архитектурой, в частности, специфической геометрией дисиалового мотива [Neu5Ac( $\alpha 2-8$ )Neu5Ac].

Как и в случае с PSA основой взаимодействия с первичным сайтом связывания является

является

высококонсервативный механизм распознавания терминального остатка Neu5Ac. Особенности распознавания ганглиозида GD2 – характер монодентатного связывания. Несмотря на наличие идентичного терминального дисиаолового мотива, жесткая трехмерная архитектура GD2 накладывает строгие стерические ограничения на топологию комплекса.

Стабилизирующая сеть водородных связей тем, что ориентация терминального остатка Neu5Ac дополнительно фиксируется локальной сетью водородных связей. Гидроксильные группы глицеринового хвоста (C7-C9) и N-ацетильная группа формируют контакты с боковыми цепями Gln122 и Tyr7, а также с основной цепью Ser118. Ключевое отличие в механизме связывания GD2 от PSA заключается в поведении второй, субтерминальной (внутренней) сиаловой кислоты.

Монодентатное связывание – терминальный остаток Neu5Ac в GD2 успешно занимает канонический сайт 1, формируя ключевой солевой мостик с Arg109, аналогичный таковому в комплексе с PSA. Этот контакт служит «молекулярным якорем».

Невозможность "бидентатного" захвата. Вследствие этой жесткости, субтерминальный остаток Neu5Ac не может изогнуться и достичь вторичного положительно заряженного сайта, образованного Arg56. Формирование второго солевого мостика, которое было ключевым для экстраординарной стабильности комплекса с PSA, для GD2 оказывается стерически невозможным. Именно это структурное ограничение является основной

причиной разницы в расчетных энергиях связывания ( $-7.26$  ккал/моль для GD2 против  $-9.68$  ккал/моль для PSA).

Если говорить об альтернативном механизме стабилизации, то несмотря на невозможность достичь Site 2, субтерминальный остаток Neu5Ac вносит существенный позитивный вклад в связывание. Его карбоксилатная и гидроксильные группы формируют дополнительную локальную сеть водородных связей с аминокислотами, фланкирующими первичный сайт связывания, в первую очередь с гидроксильной группой Tyr7 и амидной группой Gln122.

Периферическая стабилизация обуславливается компенсацией потери энергии, происходящей за счет множественных, хотя и более слабых, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий гликанового ядра (GalNAc/Gal) с поверхностью V-set домена рецептора. Суперпозиция структур показала, что ядро GD2 располагается на периферии сайта связывания, не создавая стерических конфликтов, но и не внося существенного вклада в энтальпию связывания.

Анализ суперпозиции также учитывал остальную, более протяженную часть гликанового ядра GD2 ([GalNAc( $\beta$ 1-4)][Gal( $\beta$ 1-4)]Glc-). Важным результатом является то, что гликановое ядро GD2 не создает стерических столкновений с поверхностью рецептора. Активный центр Siglec-8 является достаточно открытым и доступным, чтобы вместить такой объёмный и разветвленный лиганд. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия: Остатки N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и галактозы (Gal)

располагаются на периферии сайта связывания и формируют множественные, хотя и слабые по отдельности, Ван-дер-Ваальсовы контакты с поверхностью V-set домена Siglec-8. Сумма этих неспецифических взаимодействий вносит дополнительный, благоприятный вклад в общую энергию связывания.

**Выводы.** Полученные структурные данные позволяют по-новому взглянуть на молекулярную природу иммунной супрессии в микроокружении опухоли.

Выявленный механизм бидентатного захвата PSA объясняет экспериментально наблюдаемую экстраординарную аффинность Siglec-8. Способность рецептора одновременно связывать два звена полимерной цепи превращает его в эффективную «ловушку» для опухолевых муцинов.

Гиперэкспрессия PSA и GD2 на поверхности нейробластом и карцином не просто создает физический барьер («гликановый щит»), но

формирует активное лигандное поле. Высокоаффинное связывание этих лигандов с Siglec-8 на поверхности эозинофилов и тучных клеток приводит к кластеризации рецепторов. Согласно известным путям сигнальной трансдукции, это вызывает фосфорилирование ITIM-мотивов внутриклеточных доменов, рекрутирование фосфатаз SHP-1/2 и последующий запуск каскадов апоптоза (в эозинофилах) или ингибирования дегрануляции (в тучных клетках).

Идентификация критической роли пары аминокислот Arg109 и Arg56 валидирует их как мишени для рационального драг-дизайна. Разрыв оси «PSA/GD2 – Siglec-8» путем блокирования сайта бидентатного захвата может стать стратегией для «освобождения» иммунных клеток из супрессивного плена и восстановления их противоопухолевой активности, ликвидируя локальную «мертвую зону» иммунитета вокруг опухоли.

### Литература

1. Kirschner K. N. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field for carbohydrates // *Journal of Computational Chemistry*. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 622–655.
2. Berman H. M. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 235–242.
3. Waterhouse A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.

# MOLECULAR MECHANISM OF RECOGNITION OF POLYSIALIC ACID AND GANGLIOSIDE GD2 BY SIGLEC-8 RECEPTOR: THE ROLE OF BIDENTATE ELECTROSTATIC TRAPPING

*Borisov B. V., Dyatko P. G.*

*Tutor: PhD, associate professor Lakhvich T. T.*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Resume.** On the basis of structural analysis in silico molecular interaction mechanism of Siglec-8 receptor with highly active tumor ligands has been deciphered. It has been established that the high stability of Siglec-8/PSA complex ( $\Delta G < -9$  kkal/mol) is provided by synergetic effect of "bidentate electrostatic capture": flexible chain of PSA simultaneously forms two salt bridges with Arg109 and Arg56 remnants. At the same time binding of ganglioside GD2 is restricted by its rigid steric structure, allowing only monodentate anchor interaction with Arg109, which explains the difference in binding energies. The work presents the first structural justification of PSA/GD2-Siglec-8 axis as a strong inhibition mechanism of immune response and validates it as perspective therapeutic target.

**Keywords:** cancer cells, Siglec-8, GD2, PSA, structural analysis, bidentate trapping, salt bridges, conformational rigidity, polysialic acid, immunosuppression.