

ИЗУЧЕНИЕ *IN SILICO* ИНГИБИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НАФАМОСТАТА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В ОТНОШЕНИИ ИЗОФОРМ УРОКИНАЗЫ

Байроченко Д. С.

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
bairon0404@gmail.com*

Введение. Урокиназный активатор плазминогена (урокиназа) – это внеклеточная сериновая протеаза (ген PLAU, длинное плечо 10 хромосомы человека). В опухолевых клетках экспрессия гена PLAU усиливается в несколько раз, что ведет к повышению активности урокиназы. Последнее вызывает нарушение межклеточных адгезионных контактов и усиление процессов разрушения внеклеточного матрикса, что может способствовать прогрессированию опухолей и метастазированию. В ряде исследований было показано, что высокий уровень урокиназы у пациентов может коррелировать с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [1].

Перспективное направление химиотерапии злокачественных заболеваний – поиск лекарственных препаратов, способных связываться с активным центром урокиназы, ингибируя ее активность, и тем самым значительно сдерживать метастазирование и дальнейшее развитие опухоли.

При разработке ингибиторов *in silico* необходимо проводить анализ эффективности действия лигандов в отношении разных изоформ фермента, так как это даст более полную картину в контексте эффективности действия потенциальных лекарственных средств.

Целью исследования: моделирование *in silico* третичных структур ряда изоформ урокиназы с использованием сервиса SWISS-MODEL [2] для проведения молекулярного докинга и оценки эффективности связывания фермента с Нафамостатом (NM) и его производными 6-(N-метилкарбамидоил) нафталин-2-ил-4-гуанидилбензоатом (NNGB) и 6-карбомидоилнафталин-2-ил-4-(3,3-диметилгуанидино) бензоатом (CNDB) для выявления наиболее успешных образцов, способных препятствовать прогрессированию опухолевого процесса.

Материалы и методы. Поиск аминокислотных последовательностей изоформ урокиназы осуществлялся в базах UniProt [3] и NCBI. Были найдены следующие варианты фермента: P00749-1, P00749-2, изоформа 3, изоформа Cra_a. Вариант P00749-1 имеет длину 431 аминокислотных остатка (а.о.), является каноничным, его третичная структура установлена и находится в открытом доступе в базе данных AlphaFold [4]. Вариант P00749-2 образуется в результате альтернативного сплайсинга, имеет длину 414 а.о. Вариант 3 имеет

более короткий N-конец (по сравнению с P00749-1), обладает длиной 345 а.о. Вариант Cra_a имеет длину 431 а.о.

Проведено моделирование третичной структуры изоформ P00749-2, Cra_a и варианта 3 в SWISS-MODEL. Анализ качества полученных 3D-структур осуществлялся с помощью карт Рамачандрана с разрешением 2,0 Å, построенных для каждой модели с помощью сервиса SAVES v6.0.

Известно также, что изоформа P00749-1 имеет мультидоменную структуру и включает N-концевой домен, крингл-участок и домен сериновой протеазы на С-конце, секретируется в виде профермента со сниженной активностью. Ее ферментативная активность значительно повышается при отщеплении N-концевого и крингл-участков, поведение же иных изоформ в контексте активности до конца не ясно. Поэтому был проведен дополнительный докинг с установленной ранее кристаллографическим методом активной формой: 7vm4 (в базе данных Protein Data Bank).

Для молекулярного докинга и визуализации полученных комплексов использовалась программа AutoDock 4.2. Для анализа применялся генетический алгоритм Ламарка с числом прогонов 50 и размером популяции 150.

Результаты исследования. Были получены 3D-структуры изоформ P00749-2, Cra_a и изоформы 3 урокиназы. Проведено построение карт Рамачандрана для каждой из полученных моделей с целью установления степени их пригодности для проведения дальнейшего докинга (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристики карт Рамачандрана для полученных моделей

Регионы карты \ Изоформы	P00749-2	3	Cra_a
Рамачандран основной, %	89,5	88,5	85,4
Рамачандран разрешенный, %	10,2	11,2	12,7
Рамачандран в целом разрешенный, %	0,3	0,0	1,4
Рамачандран запрещенный, %	0,0	0,3	0,5

Полученные модели удовлетворяют предъявляемым запросам качества (значение для основного региона 85% и выше, минимальное количество аминокислотных остатков в запрещенных регионах).

Проведен молекулярный докинг с установлением центра GridBox в область активного центра фермента с координатами -29,1072; -17,5636; -5,1267.

Из результатов докинга, представленных в таблице 2, видно, что лучшими значениями энергии связывания обладает лиганд NNGB. Также установлено, что значения энергии Гиббса среди изоформ с одноименным лигандом варьируют незначительно. Для 7vm4 характерны меньшие значения энергии связывания, что, вероятно, связано с ее более высокой ферментативной активностью.

Таблица 2 – Характеристика взаимодействий лигандов и изоформ урокиназы (энергия связывания, ккал/моль)

Лиганды Изоформы	NM	NNGB	CNDB
P00749-2	-9,20	-11,42	-10,83
Изоформа 3	-9,31	-11,69	-11,24
Изоформа Cra_a	-8,65	-11,47	-10,81
P00749-1	-9,34	-11,74	-11,86
7vm4	-10,15	-13,88	-13,47

Выводы. С использованием сервиса SWISS-MODEL установлены высококачественные 3D-модели для трех изоформ урокиназы. Полученные данные позволяют предполагать более высокую фармакологическую активность у лиганда NNGB. При этом каждое из изученных соединений обладает схожими значениями эффективности для всех изоформ урокиназы. Для уточнения поведения изоформ P00749-2, Cra_a и варианта 3 необходимы дополнительные исследования *in vitro*.

Литература

1. Duffy, M. J. uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies / M.J. Duffy [et al.] // Breast Cancer. – 2014. – Vol. 16, № 4. – P. 428. – Mode of access: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13058-014-0428-4>.
2. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303. – Mode of access: <https://academic.oup.com/nar/article/46/W1/W296/5000024>.
3. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 / UniProt Consortium // Nucleic Acids Res. – 2023. – Vol. 51, № D1. – P. D523–D531. – Mode of access: <https://academic.oup.com/nar/article/51/D1/D523/6835362>.
4. Jumper, J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper [et al.] // Nature. – 2021. – Vol. 596, № 7873. – P. 583–589. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/s41586-021-03819-2>.

STUDY IN SILICO OF THE INHIBITORY PROPERTIES OF NAFAMOSTAT AND ITS DERIVATIVES TOWARDS UROKINASE ISOFORMS

Bairachenka D. S.

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

bairon0404@gmail.com

This article presents the results of modeling a number of urokinase isoforms. Molecular docking of urokinase isoforms with Nafamostat and its derivatives was

carried out in order to study the dependence of potential pharmacological properties of ligands on selected isoforms.

Министерство здравоохранения Республики Беларусь
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**«СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ МОЛОДЫХ
УЧЁНЫХ В МЕДИЦИНЕ - 2023»**

*Сборник материалов
X Республиканской научно-практической конференции
с международным участием*

30 ноября 2023 г.

Гродно
ГрГМУ
2023