

# IN SILICO СКРИНИНГ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИПЕРСИАЛИРОВАННЫЙ ГЛИКАНОВ ОПУХОЛЕЙ С ИНГИБИТОРНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ ИММУННЫХ КЛЕТОК: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

*Борисов В. Б. Дятко Г. П.*

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

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

**Резюме.** На выборке из 10 молекулярных систем (4 лиганда x 5 рецепторов) с использованием алгоритма AutoDock GPU показано, что рецепторы Siglec-9, LILRB1 и KIR2DL1 демонстрируют низкую аффинность или отсутствие связывания. Рецептор Siglec-8 проявил высокую селективность и аффинность к сиалированным лигандам. Установлено, что максимальная энергия связывания достигается в комплексах Siglec-8 с полисиаловой кислотой (PSA,  $\Delta G = -9.68$  ккал/моль) и дисиалоганглиозидом GD2 ( $\Delta G = -7.26$  ккал/моль). Полученные данные статистически достоверно выделяют Siglec-8 как ключевой рецептор, потенциально участвующий в распознавании гликанового профиля опухоли.

**Ключевые слова:** молекулярный докинг, скрининг, раковые клетки, Siglec-8, гликаны, PSA, GD2, иммунная толерантность.

**Актуальность.** Гиперсиалирование гликанов изменяет профиль гликозилирования клеточной поверхности, что приводит к злокачественной трансформации. Последнее приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа, что коррелирует с метастатическим потенциалом опухоли, устойчивостью к терапии и неблагоприятным прогнозом для пациентов.

Ключевую роль в уничтожении раковых клеток играют цитотоксические лимфоциты, в частности, естественные киллеры (NK-клетки) и Т-лимфоциты. NK-клетки представляют собой первую линию врожденного иммунитета, способную распознавать и уничтожать злокачественные клетки без предварительной сенсibilизации. Их активность регулируется балансом сигналов, получаемых от

активирующих и ингибиторных рецепторов на их поверхности. Раковые клетки экспрессируют лиганды для ингибиторных рецепторов, что позволяет им "выключать" атакующие лимфоциты и избегать иммунного надзора.

Известно, что сиаловые кислоты на поверхности опухоли могут служить лигандами для известных ингибиторных рецепторов семейства Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins), экспрессируемых на иммунных клетках, включая NK-клетки (например, Siglec-7 и Siglec-9). Связывание этих рецепторов подавляет цитотоксическую активность NK-клеток. Выделено большое число сиалированных гликановых структур на раковых клетках [1, 3-5]. Тип гликозидной связи ( $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,6 или  $\alpha$ -2,8), базовая структура гликана

и пространственная организация этих молекул формируют сложные и уникальные "паттерны". Однако до настоящего времени детально не изучалось взаимодействие всего спектра опухолевых сиалогликанов с менее известными членами семейства Siglec, такими как Siglec-8, а также с рецепторами других семейств (KIR, LILRB1).

**Цель:** проверка в эксперименте *in silico* гипотезы о том, что уникальные паттерны гиперсиалированных гликанов на поверхности раковых клеток служат лигандами для специфических ингибиторных рецепторов NK-клеток и Т-лимфоцитов, что приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа.

#### **Задачи:**

1. Сформировать и валидировать *in silico* библиотеку трехмерных моделей опухоль-ассоциированных гликанов (sLe<sup>x</sup>, sTn, GD2, PSA) и ингибиторных рецепторов (Siglec-7, -8, -9, LILRB1, KIR2DL1).

2. Провести высокопроизводительный молекулярный докинг для всей панели пар «лиганд-рецептор» с целью оценки термодинамической вероятности образования комплексов.

3. Выполнить статистический анализ энергий связывания ( $\Delta G$ ) и построить тепловые карты взаимодействий для идентификации лидерных комплексов.

4. Отфильтровать рецепторы с низким или нулевым сродством (Siglec-9, LILRB1, KIR2DL1) и обосновать выбор приоритетной мишени для дальнейшего изучения.

**Материалы и методы.** Докинг проведен с использованием программного обеспечения AutoDock GPU

(версия 1.2.0). Была сформирована панель из десяти молекулярных систем: четырёх опухоль-ассоциированных гиперсиалированных гликанов и пяти релевантных ингибиторных рецепторов иммунных клеток. В качестве трехмерных (3D) структур белков-мишеней использовались кристаллические структуры, полученные из Protein Data Bank (PDB) : для рецепторов Siglec-7, Siglec-8, LILRB1 и KIR2DL1 были загружены и очищены экспериментальные структуры из всемирного банка данных Protein Data Bank (PDB) [6]. Были выбраны следующие PDB-идентификаторы: 1O7S (Siglec-7, апоформа), 4Q20 (Siglec-8, в комплексе с лигандом, что точно определяет сайт связывания), 1G0X (LILRB1, внеклеточные домены) и 1NKR (KIR2DL1, внеклеточные домены). Для Siglec-9, не имеющего экспериментальной структуры, была сгенерирована высокоточная гомологичная модель с помощью сервера SWISS-MODEL [7], используя структуру Siglec-7 (1O7S) в качестве шаблона ввиду высокой (>75%) идентичности последовательностей их лиганд-связывающих доменов.

Выбор гликанов-кандидатов основывался на критериях: доказанная гиперэкспрессия в опухолях; наличие терминальных остатков сиаловой кислоты; подтвержденная роль в ключевых аспектах онкогенеза, таких как метастазирование и иммунное уклонение [2]. Антиген Сиалил-Льюис X (sLe<sup>x</sup>) [Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R]; Антиген Сиалил-Tn (sTn), [Neu5Ac(α2-6)GalNAc(α1)-O-Ser/Thr]; Дисиалоганглиозид GD2, [Neu5Ac(α2-

8) Neu5Ac( $\alpha$ 2-3)Gal( $\beta$ 1-4)Glc-Ceramide]; Полисиаловая кислота (PSA). Для всех четырёх гликанов-лигандов, ввиду их высокой конформационной гибкости и отсутствия репрезентативных экспериментальных структур в свободном состоянии, сгенерированы энергетически корректные трехмерные модели de novo. Эта процедура была выполнена с помощью специализированного веб-сервера GLYCAM-Web Carbohydrate Builder, который использует

параметризацию силового поля GLYCAM06, разработанного и валидированного специально для точного моделирования углеводов [8].

Для каждого лиганда проводилось 10 независимых запусков докинга, включающий по 500 прогонов для каждой пары лиганд-рецептор, и для анализа отбирался комплекс с наименьшей энергией связывания. Проанализированы распределения всех значений  $\Delta G$  для каждого лиганда.

**Табл. 1.** Характеристика выбранных гликанов

№	Название гликана	Сокращение	Тип структуры	Ключевые ассоциированные опухоли
1	Антиген Сиалил-Льюис X	sLe <sup>x</sup>	Тетрасахарид (N/O-гликаны)	Аденокарциномы (легкие, поджелудочная, ЖКТ)
2	Антиген Сиалил-Tn	sTn	Дисахарид (O-гликаны)	Карциномы (яичники, молочная железа, ЖКТ)
3	Дисиалоганглиозид GD2	GD2	Гликосфинголипид	Нейробластома, меланома
4	Полисиаловая кислота	PSA	Полисахарид (N-гликаны)	Нейроэндокринные опухоли (нейробластома, МРЛ)

**Результаты и их обсуждение.** первый этап исследования in silico был направлен на получение первичной карты взаимодействий между выбранными опухоль-ассоциированными гликанами и панелью ингибиторных рецепторов. Цель этого этапа

– не исчерпывающий анализ, а скорее "разведка боем", позволяющая выявить наиболее перспективные пары для последующего углубленного изучения и отсеять заведомо бесперспективные комбинации.

**Табл. 2.** Характеристика выбранных рецепторов

№	Название рецептора	Тип рецептора	Ключевая экспрессия	PDB ID	Ингибиторный механизм (наличие ITIM)

Продолжение таблицы 2

1	<i>Siglec-7</i>	<i>CD328</i>	Лектин (Ig-суперсемейство)	Ig-подобный рецептор	<i>IO7S</i>	Да (2 ИТИМ-подобных мотива)
2	<i>Siglec-9</i>	<i>CD329</i>	Лектин (Ig-суперсемейство)	НК-клетки, Т-клетки, моноциты	(Шаблон <i>IO7S/2N7A</i> )	Да (2 ИТИМ-подобных мотива)
3	<i>Siglec-8</i>	-	Лектин (Ig-суперсемейство)		<i>2N7A</i>	Да (2 ИТИМ-подобных мотива)
4	<i>LILRB1</i>	<i>ILT2, CD85j</i>	Ig-подобный рецептор	НК-клетки, Т-клетки	<i>IG0X</i>	Да (4 ИТИМ-мотива)
5	<i>KIR2DL1</i>	<i>CD158a</i>	Ig-подобный рецептор	НК-клетки, Т-клетки	<i>INKR</i>	Да (2 ИТИМ-мотива)

Табл. 3. Сводная таблица статистик энергий связывания

Рецептор	<i>sTn</i>	<i>PSA</i>	<i>GD2</i>	<i>X</i>
<i>Siglec-7</i>	-1.80	-1.88	-1.71	-1.84
<i>Siglec-8</i>	-6.25	-9.68	-7.26	-6.64
<i>Siglec-9</i>	-0.03	-0.11	-0.06	-0.03
<i>LILRB1</i>	-0.04	-0.16	-0.08	-0.04
<i>KIR2DL1</i>	0.00	0.02	0.01	0.00

Результаты были сведены в матрицу энергий, визуализированную в виде тепловой карты, где каждой паре "рецептор-лиганд" соответствует

ячейка, отражающая наиболее энергетически выгодную позу связывания ( $\Delta G$ , ккал/моль).

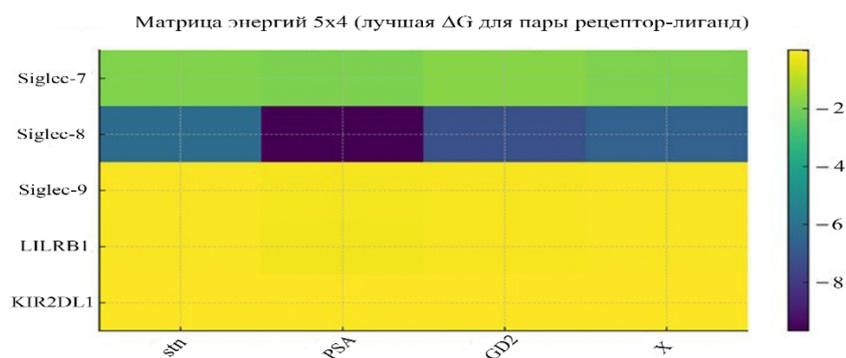


Рис. 1 – Матрица энергий связывания

*Siglec-8* показал высокую активность. Вся строка, соответствующая этому рецептору, окрашена в

интенсивные "холодные" тона, что указывает на стабильное и энергетически выгодное связывание со всеми

тестируемыми гликанами. Наиболее сильное взаимодействие наблюдается с полисиаловой кислотой (PSA), где энергия связывания достигает выдающегося значения -9.68 ккал/моль. Это значение существенно превосходит все остальные в матрице и указывает на потенциально очень высокую аффинность и стабильность комплекса. Также отмечается сильное связывание с дисиалоганглиозидом GD2 (-7.26 ккал/моль) и антигеном Сиалил-Льюис X (-6.64 ккал/моль).

Взаимодействия с участием Siglec-7 можно охарактеризовать как слабые, но специфичные.  $E_{св}$  - в диапазоне от -1.71 до -1.88 ккал/моль. Это говорит о том, что возможный комплекс будет короткоживущим и быстро диссоциирующим.

Рецепторы Siglec-9 и LILRB1 демонстрируют очень слабые энергии связывания (-0.03...-0.16 ккал/моль), что указывает на нестабильные, транзитные контакты, которые не способны сформировать устойчивый сигнальный комплекс, необходимый для ингибирования иммунной клетки.

Рецептор KIR2DL1, как рецептор, распознающий белковые эпитопы молекул HLA-C, показал нулевые или даже положительные значения  $\Delta G$ , что дополнительно валидизирует предложенную модель. Его неспособность связывать гликановые лиганды полностью соответствует результатам предыдущих исследований [7].

Были проанализированы полные наборы данных для каждого рецептора.

Табл. 4. Статистика энергий связывания

Рецептор	N	Среднее $\Delta G$ , ккал/моль	Медиана $\Delta G$ , ккал/моль	Min $\Delta G$ , ккал/моль	Max $\Delta G$ , ккал/моль	$\sigma$ (stdev), ккал/моль
<b>Siglec-7</b>	1440	-0.677	-0.67	-1.88	-0.05	0.411
<b>Siglec-8</b>	1534	-4.599	-4.8	-9.68	-0.02	1.334
<b>Siglec-9</b>	1440	-0.052	-0.035	-0.11	-0.02	0.029
<b>LILRB1</b>	1440	-0.054	-0.04	-0.16	-0.02	0.033
<b>KIR2DL1</b>	3600	5.332	4.78	0.0	11.96	4.788

Данные коррелируют с предыдущими результатами. Средняя  $E_{св}$  для Siglec-8 (-4.599 ккал/моль) значительно ниже, чем для других рецепторов. Широкий диапазон энергий (от -9.68 до -0.02) и высокое стандартное отклонение (1.334) указывают на то, что Siglec-8 эффективно связывает лиганды в различных конформациях; при этом существуют особенно

выгодные позы.

На основе фильтрации по  $E_{св}$  ( $\Delta G < -9.45$  ккал/моль) и биоподобности контактов был составлен шорт-лист наиболее вероятных пар "лиганд-рецептор". Комплекс Siglec-8/фрагмент полисиаловой кислоты имеет наименьшее значение  $E_{св}$  ( $\Delta G \ll -9$  ккал/моль), что свидетельствует о формировании стабильного

высокоаффинного комплекса, и указывает на наличие уникального, синергетического механизма распознавания.

#### **Выводы:**

1. Подтверждена специфичность используемой модели молекулярного докинга. Рецептор KIR2DL1, являющийся классическим распознавателем белковых эпитопов МНС класса I, продемонстрировал нулевые или положительные значения энергии связывания (ккал/моль) со всеми протестированными гликанами, что согласуется с известными экспериментальными данными и служит внутренним контролем качества исследования.

2. Рецепторы Siglec-9 и LILRB1 показали крайне слабую способность к связыванию опухолевых сиалогликанов. Рассчитанные энергии взаимодействия находятся в диапазоне от -0.03 до -0.16 ккал/моль, что характеризует такие контакты как транзистентные и термодинамически нестабильные. Это позволяет исключить данные рецепторы из списка приоритетных

мишеней, опосредующих прямую гликановую супрессию в рамках данной модели.

3. Выявлена высокая и селективная активность рецептора Siglec-8. В отличие от других членов семейства, Siglec-8 формирует высокостабильные комплексы с гиперсиалированными лигандами. Наиболее впечатляющие результаты получены для полисиаловой кислоты (PSA) с энергией связывания -9.68 ккал/моль и дисиаialogанглиозида GD2 ( = -7.26 ккал/моль).

4. Полученные данные позволяют выделить ось «PSA/GD2 – Siglec-8» как наиболее вероятный и термодинамически выгодный путь уклонения опухоли от иммунного «надзора», осуществляемого эозинофилами и тучными клетками. Высокая аффинность делает Siglec-8 приоритетным кандидатом для структурного анализа с целью расшифровки молекулярного механизма распознавания, который будет являться основой для дальнейшего исследования.

#### **Литература**

1. Kannagi, R. Sialyl-Lewis X and related carbohydrate antigens: their roles in the selection of high-metastatic cancers and in the recruitment of inflammatory leukocytes / R. Kannagi [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. – 2021. – Vol. 169, № 1. – P. 1–13.
2. La-Beck, N. The “sweet” side of immune checkpoints: the role of glycans in tumor-immune interactions / N. M. La-Beck, G. W. Jean // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 1765.
3. Julien, S. Sialyl-Tn in cancer: (how) did we miss the target? / S. Julien [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 305.
4. Barrow, F. The role of the sialyl-Tn antigen in cancer progression / F. Barrow [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 16. – P. 8593.
5. Guan, F. Gangliosides GD2 and GD3 in cancer / F. Guan, C. Zou, Y. Liu // *Glycoconjugate Journal*. – 2022. – Vol. 39, № 2. – P. 159–169.
6. Berman, H. M. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 235–242.
7. Waterhouse, A. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.

8. Kirschner, K. N. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field for carbohydrates / K. N. Kirschner [et al.] // Journal of Computational Chemistry. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 622–655.

## IN SILICO SCREENING OF TUMOR HYPERSIALYLATED GLYCANS INTERACTION WITH INHIBITORY RECEPTORS OF IMMUNE CELLS: A COMPARATIVE THERMODYNAMIC ANALYSIS

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

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

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Resume.** Using a sample of 10 molecular systems (4 ligands x 5 receptors), the AutoDock GPU algorithm showed that the receptors Siglec-9, LILRB1, and KIR2DL1 exhibit low affinity or no binding. Siglec-8 receptor exhibited high selectivity and affinity for sialylated ligands. It was found that the maximum binding energy was achieved in complexes of Siglec-8 with polysialic acid (PSA,  $\Delta G = -9.68$  kcal/mol) and disialoganglioside GD2 ( $\Delta G = -7.26$  kkal/mol). Results attributed Siglec-8 as a key receptor potentially involved in the recognition of the tumor glycan profile.

**Keywords:** molecular docking, cancer, Siglec-8, glycans, PSA, GD2, immune tolerance.