

На правах рукописи



ГУРЕЕВ Максим Александрович

**ДОМЕННАЯ ПОДВИЖНОСТЬ N-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА
УБИКВИТИН-Е3 ЛИГАЗЫ MDM2 В ПРИСУТСТВИИ
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МИМЕТИКОВ БЕЛКА P53**

02.00.16 – медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», в научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная фармакология»

Научный руководитель:

Гарабаджиу Александр Васильевич – доктор химических наук, проректор по научной работе ФГБОУ ВО Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета).

Официальные оппоненты:

Лужков Виктор Борисович, доктор химических наук, главный научный сотрудник отдела кинетики химических и биологических процессов ФГБУН «Института проблем химической физики» Российской академии наук.

Палюлин Владимир Александрович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией медицинской химии ФГБОУ ВО Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «26» мая 2020 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д002.102.02 при ФГБУН «Институт физиологически активных веществ Российской академии наук» по адресу: 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1, Зал ученого совета.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте <http://www.ipas.ac.ru> и в библиотеке ИФАВ РАН по адресу: 142432, Московская область, Ногинский район, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук



Афанасьева Светлана Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время всё большее число исследований посвящено изучению аспектов лиганд-белковых взаимодействий, аффилированных с процессами патогенеза в организме человека, с целью поиска новых лекарственных препаратов. Разработка таких препаратов базируется на стратегии «золотой пули», сформированной Паулем Эрлихом, который ещё в начале XX века постулировал задачи, актуальные для современной медицинской химии: разработка лекарств, воздействующих исключительно на патогенетический процесс.

С развитием компьютерных технологий современная наука кардинально изменилась. Бурное развитие получила отрасль медицинской химии за счёт внедрения и развития вычислительных технологий, новых методов моделирования и обработки данных, связанных с малыми молекулами. В свою очередь применение методов молекулярного моделирования и анализа большого объёма данных позволило повысить эффективность поиска новых лекарств.

Современный дизайн лекарственных препаратов использует несколько вариантов подходов (таблица 1), реализуемых в зависимости от наличия экспериментальных данных о действующих веществах и мишени.

Таблица 1 Основные подходы поиска новых структур в зависимости от наличия входных данных

| | Лиганд известен | Лиганд неизвестен |
|--------------------------------|---|---|
| Известна структура рецептора | Структурно-ориентированный молекулярный дизайн (SBDD) Лиганд-белковый докинг; молекулярная динамика в разных её приложениях; поиск по комплементарности форм. | De novo дизайн |
| Структура рецептора неизвестна | Лиганд-ориентированный молекулярный дизайн поиск по подобию; фармакофорный поиск; количественное соотношение; структура-активность (QSAR). | CADD неприменим необходимы экспериментальные данные |

Каждый подход определяет спектр инструментов и методы исследований, которые могут быть использованы в процессе поиска новых структур, валидации их активности и оптимизации.

Самое высокое разнообразие используемых инструментов, методов и подходов характерно для задач с высокой степенью изученности интерактантов, исследуемых в рамках какого-либо заболевания. В таких случаях можно отталкиваться от существующих экспериментальных данных для пар лиганд-рецептор.

Особое внимание уделяется изучению взаимодействий между лигандами и их рецепторами (стоит отметить, что лигандом может быть как малая молекула, так и белок или нуклеиновая кислота). Влияние на взаимодействие лиганд-рецептор может опосредовать регулирование процесса патогенеза, связанного с исследуемым заболеванием. Зачастую целью разработки является подбор малых молекул, которые ориентированы на определённый участок мишени с известными свойствами и функциями.

Подобная парадигма исследований в настоящее время обладает наибольшим весом среди всех остальных ввиду возможности обработки большого числа малых молекул и широких возможностей оптимизации.

Причина столь высокой актуальности исследований лиганд-белковых взаимодействий заключается в том, что они представляют широкий класс терапевтических мишеней как внутри клетки, так и вне её пределов. Ни одно действие в клетке не обходится без подобного рода взаимодействий.

Однако, несмотря на важность лиганд-белковых и белок-белковых взаимодействий как мишени в биологии, большую трудность составляет трансляция результатов исследования в область терапии. Еще двадцать лет назад многие белок-белковые взаимодействия считались неразрешимыми с точки зрения вычислительного моделирования. Структуры белков в высоком разрешении, исследуемые с 1980-х по 1990-е годы, показали, что интерфейсы белок-белковых взаимодействий в основном плоские и широкие (в диапазоне 1000-2000 Å² для каждого интерактанта) [Hwang et al., 2010], а области связывания малых молекул наоборот – выражены в виде глубоких полостей и ограничены поверхностью в диапазоне 300-500 Å² [Fuller, 2009].

В период конца 90-х – первой половины двухтысячных годов появились первые препараты, относящиеся к классу ингибиторов белок-белковых взаимодействий (PPI's inhibitors). Клинически апробированные антагонисты интегрина (тирофибан) и природные таксаны – рапамицин и циклоспорин – продемонстрировали яркий пример того, что белок-белковые взаимодействия могут модулироваться малыми молекулами. Анализ белковых структур показал, что не все участки играют критическую роль в процессе белок-белкового взаимодействия. Для них характерно наличие «горячих точек», концентрирующих в себе большую часть энергии связывания. Они, как правило, группируются в центре активного сайта, чтобы покрыть область, сравнимую с размером малой молекулы, для них также характерны гидрофобные свойства и проявление конформационной адаптивности. Эти особенности позволяют предположить, что по крайней мере некоторые структуры могут обладать участками размером с небольшую молекулу, которые способны связывать низкомолекулярные соединения с некоторой динамической адаптацией. В свою очередь, динамические процессы внутри структуры рецептора могут объяснять механизм биологической активности низкомолекулярных агентов.

В данной работе рассматривается белок-онкоген Mdm2 (убиквитин-е3 лигаза), отвечающий за процесс негативной регуляции белка p53 за счёт его связывания, убиквитинилирования и экспорта из ядра. В нормальных клетках функция Mdm2 заключается в предотвращении самопроизвольного запуска процессов программированной клеточной смерти. Однако при стрессовом воздействии на клетку с последующим повреждением генетического материала белок-белковый комплекс Mdm2-p53 распадается. Высвобождение белка p53, в свою очередь, запускает процессы, связанные с репарацией ДНК, а если повреждения критические – процессы клеточной смерти. В процессах канцерогенеза данная альтруистическая модель поведения клеток нарушена вследствие гиперэкспрессии белка Mdm2, поэтому данному белку присвоен статус онкогена. В связи с этим рассматриваемый белок является перспективной мишенью для разработки низкомолекулярных агентов, предотвращающих его взаимодействие с белком p53. В настоящее время существует уже более десятка различных классов соединений, описанных как ингибиторы белок-белкового взаимодействия Mdm2-p53,

однако в структуре данного белка остается ряд не изученных ранее нюансов, требующих уточнения.

Убиквитин-Е3 лигаза Mdm2 в области N-концевого домена содержит подвижный участок, роль которого в процессах комплексообразования с ингибиторами до сих пор изучена в недостаточной мере. При этом экспериментально установлено, что фрагмент N-концевого домена на участке с 1 по 20 аминокислоту активно участвует в процессах взаимодействия как с белком p53, так и с его низкомолекулярными миметиками, однако его роль в комплексообразовании достоверно не установлена, поэтому исследование механизмов взаимодействий подвижного интерфейса N-концевого домена белка-онкогена Mdm2 с низкомолекулярными ингибиторами определяет актуальность выбранной темы.

Степень разработанности темы исследования. Изучение подвижности белкового интерфейса N-концевого домена белка-онкогена Mdm2 актуально с 2003 года. Именно тогда авторы статьи в журнале PNAS [McCoy, 2003] установили наличие гибкой петли в N-концевом домене белка Mdm2, однако разрешённая структура была описана только с 16-й аминокислоты. Но и этих данных хватило, чтобы сформировать гипотезу о существовании белка в двух формах: «открытой» и «закрытой», где петля N-концевого домена способна перекрывать p53-связывающую полость. Тогда основной идеей публикации была возможность автоингибирования Mdm2, что гипотетически приводит к нарушению комплексообразования с белком p53 и последующей индукции процессов апоптоза -программируемой гибели клеток.

Другая работа [Showalter et al., 2008] свидетельствует о вовлеченности петли N-концевого домена белка Mdm2 в процесс связывания с p53. Исследователи с помощью спектроскопии ЯМР экспериментально доказали наличие у несвязанного белка Mdm2 равновесного состояния между «открытой» и «закрытой» формой. При этом взаимодействие с p53 смещает равновесие в сторону «открытой» формы, т.е. N-концевой участок освобождает p53-связывающий карман для своего основного интерактанта. Ингибиторы белка Mdm2, такие как Nutlin-3a, наоборот, не изменяют состояния N-концевого домена. Исследователи постулировали идею о том, что изучение динамики N-концевого домена Mdm2 позволит найти дополнительные ключи к подбору более эффективных ингибиторов с помощью методов экспериментального и виртуального скрининга.

В работе [Michelsen et al., 2012] описан ряд низкомолекулярных структур, которые заявлены в качестве ингибиторов белка-онкогена Mdm2, индуцирующих упорядочивание N-концевого домена, с формированием «закрытой» формы белка. Описанные в статье производные на основе пиперидинового скаффолда при взаимодействии с p53-связывающей полостью индуцируют формирование элементов вторичной структуры белка Mdm2 на участке с 10-й по 25-ю аминокислоты. Анализ лиганд-белковых комплексов с пиперидиновыми производными показал наличие дополнительного связывания с His96 в структуре белка Mdm2. Данное взаимодействие выходит за рамки стандартной фармакофорной гипотезы, описанной такой известной структурой, как Nutlin-3a, которая в полной мере воспроизводит три основных аминокислотных остатка p53: Phe19, Trp23, Leu26. Помимо этого, обнаружено также дополнительное ван-дер-ваальсово взаимодействие с Val14/Thr16, что указывает на наличие дополнительного

фактора связывания с петлёй N-концевого домена, который также может быть полезен для развития и оптимизации фармакофорной гипотезы новых ингибиторов белка Mdm2.

Авторы статьи [Mukherjee et al., 2016] с помощью вычислительных моделей Маркова установили наличие дуализма способа связывания в структуре Mdm2. Установлено, что упорядоченная структура «крышки» N-концевого домена способна формировать α -спираль, выступающую в роли автоингибиторного участка, имитирующего трансактивационный домен белка p53. Такой вариант структуры характерен исключительно для «закрытой» формы белка Mdm2, в то время как в «открытой» форме N-концевой домен подвижен и не структурирован. В ходе работы исследователи определили, что белок Mdm2 в «закрытой» форме не подходит для докинга малых молекул в p53-связывающую полость. Тогда с помощью методов молекулярной динамики был предложен ряд состояний белка, подходящих для докинга малых молекул и валидных в соотношении с экспериментально разрешёнными моделями, опубликованными в Protein Data Bank. В работе установлено, что класс лиганда влияет на степень упорядочивания и ориентацию подвижной части N-концевого домена. Следовательно, детальное изучение динамики взаимодействия разных классов ингибиторов белка Mdm2 с его N-концевым доменом имеет высокую значимость для дальнейшего дизайна оптимальных структур.

Т.о. тема диссертационного исследования в высокой степени актуальна, освещена в публикациях с высоким рейтингом цитируемости, однако данные о взаимном влиянии конформационно варибельной части N-концевого домена белка Mdm2 с ингибиторами отсутствуют.

Цель работы – проверить гипотезу о существовании не описанных взаимодействий между ингибиторами белка-онкогена Mdm2 и его конформационно варибельным N-концевым доменом. Для этого были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать динамику белка Mdm2 с полноразмерным N-концевым доменом, вне лиганд-белкового комплекса;
2. Изучить динамику белка Mdm2 с полноразмерным N-концевым доменом в присутствии актуальных ингибиторов Mdm2;
3. Изучить степень вовлеченности N-концевого домена в процесс комплексообразования с ингибитором;
4. Установить параметры, необходимые для формирования «закрытой» формы белка Mdm2;
5. Оценить возможность включения взаимодействий с петлёй N-концевого домена белка Mdm2 в фармакофорную гипотезу существующих ингибиторов.

Научная новизна. Впервые проведено моделирование молекулярной метадинамики подвижного полноразмерного N-концевого домена белка Mdm2 (1-25 аминокислота) в контексте присутствия ингибиторов разных классов. Проведённые расчёты позволили определить приоритетные конформационные состояния подвижной петли N-концевого домена. Установлены взаимодействия подвижного интерфейса с малыми молекулами,

индуцирующие формирование «закрытой» конформации лиганд-белкового комплекса Mdm2.

Для ряда соединений, выступающих в качестве кандидатов на лекарственные соединения (Nutlin-3a, Pip-1), установлено наличие не описанных ранее взаимодействий с подвижной частью N-концевого домена Mdm2, которая в большинстве опубликованных структур белка Mdm2 в RCSB Protein Databank не рассматривается ввиду технических ограничений метода РСА.

На основе результатов моделирования динамики комплексов Mdm2-ингибитор составлена расширенная фармакофорная гипотеза, учитывающая дополнительные взаимодействия, обеспечиваемые подвижным интерфейсом N-концевого домена Mdm2.

Посредством анализа молекулярной поверхности белка Mdm2 установлена значимость гидрофобных сайтов, формируемых аминокислотами Val8 и Pro9, локализованных в ранее не учитываемой петле N-концевого домена.

Впервые проведён ввод точечных мутаций, замещающих гидрофобный сайт, формируемый аминокислотами Val8 и Pro9, проведена симуляция динамики мутантных структур в комплексе с ингибитором, доказано снижение стабильности лиганд-белкового комплекса.

В работе проведён дизайн ряда перспективных структур, удовлетворяющих разработанной фармакофорной гипотезе. Расчётные и экспериментальные значения биологической активности полученных соединений превышают или эквивалентны таковым для известных ингибиторов Mdm2, опубликованных в зарубежной литературе.

Теоретическая и практическая значимость. Проведена параметризация и учёт влияния доменной подвижности в активном сайте связывания с целью уточнения предсказательной модели подбора потенциально аффинных низкомолекулярных агентов. Полученные расчётные данные о динамике лиганд-белковых комплексов Mdm2 расширяют теоретические знания об особенностях динамики петли N-концевого домена в присутствии его ингибиторов. Моделирование динамических процессов внутри лиганд-белковых комплексов, а также картирование параметра свободной энергии позволило дифференцировать границу между активными и малоактивными соединениями. Определен ряд гидрофобных контактов с петлёй N-концевого домена белка Mdm2, статистически реализуемых его высокоактивными ингибиторами. На основе проведённых симуляций разработана новая фармакофорная гипотеза ингибиторов белка-онкогена Mdm2, где учитывается фактор динамического гидрофобного взаимодействия с петлёй его N-концевого домена.

Методы исследования. Для определения доменных движений в структуре белка-онкогена Mdm2 и его комплексах с ингибиторами, использовали методы молекулярной динамики и метадинамики, заложенные в функционал программного обеспечения Schrodinger Suite, модуль Desmond. Для расчётов использованы экспериментально разрешённые структуры белков, полученные методами РСА или ЯМР, опубликованные в открытой базе данных RCSB Protein Data Bank. Все исследованные структуры прошли проверку на наличие ошибок (некорректные длины связей, углы, пропуски аминокислот и т.д.). Анализ расчётных данных выполнен средствами пакета программ Schrodinger Suite.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Мишень-специфичные ингибиторы индуцируют переход подвижной части N-концевого домена Mdm2 в «закрытое» конформационное состояние;
2. Структуры с экспериментально разрешённой мишень-специфичностью гидрофобно взаимодействуют с петлёй N-концевого домена белка Mdm2;
3. Все активные ингибиторы Mdm2 взаимодействуют с участком петли N-концевого домена белка Mdm2 в области аминокислот Ser7-Pro9;
4. Малоактивные и неактивные ингибиторы Mdm2 не взаимодействуют с петлёй N-концевого домена и, как следствие, способны покидать p53-связывающий сайт.
5. Гидрофобный интерфейс, реализуемый аминокислотами Val8 и Pro9 в петле N-концевого домена белка Mdm2, необходим для стабильного перехода лиганд-белкового комплекса в область минимума свободной энергии.

Достоверность результатов обеспечена за счёт соотнесения и валидации вычислительных моделей с экспериментально разрешёнными комплексами белка-онкогена Mdm2 и его ингибиторами, для которых установлены параметры сайтоспецифичности. Используемые в работе вычислительные методы и программное обеспечение обладают приемлемой предсказательной способностью. Всего проведено 84 вычислительных эксперимента, использующих экспериментально разрешённые модели белка Mdm2, воспроизводимость результатов достигнута за счёт многократности повторения расчётов.

Личный вклад соискателя. В основу настоящей работы положены результаты исследований, проведённых автором на основе серии экспериментальных моделей, описывающих факт лиганд-индуцируемого включения петли N-концевого домена в процесс комплексообразования. Автор принимал непосредственное участие в создании вычислительных моделей, обработке результатов вычислений молекулярной динамики, анализе траекторий; самостоятельно интерпретировал и обобщал полученные данные. Автор также участвовал в обсуждении результатов и написании материалов публикаций совместно с соавторами статей, представлял доклады на конференциях различного уровня.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены на конференциях: «МедХим Россия» (Екатеринбург, 9-14 июня 2019г.); «Менделеев - 2017» (С-Петербург, 4-7 апреля 2017г.); «ОргХим-2016» (С-Петербург, 27 июня — 1 июля 2016); XXII Симпозиум «Человек и лекарство» (Москва, 6-10 апр. 2015); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (С-Петербург, 17 ноя. 2014); Конференция, приуроченная к 186-й годовщине образования Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического института) (С-Петербург, 28 ноя. 2014); Симпозиум Euro-QSAR 2014 (С-Петербург, 28-30 авг. 2014); XXI Симпозиум «Человек и лекарство» (Москва, 7-11 апр. 2014); Конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 23-25 мая 2013).

Объём и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка использованной литературы и приложения, содержащего цветные изображения трёхмерных структур комплексов белка Mdm2 с исследуемыми соединениями. Материал изложен на 131 странице машинописного текста, содержит 11 таблиц, 79 рисунков. Список литературы включает 134 ссылки.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 научных работ, из них - 7 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 объекта интеллектуальной собственности, 15 тезисов докладов на конференциях. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в проведении вычислительных экспериментов, их интерпретации, обсуждении полученных результатов, написании материалов публикаций (статей, тезисов). Права соавторов публикаций не нарушены.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы, д.х.н. А.В. Гарабаджиу за помощь в выборе темы исследований, оформлении работы. Особую благодарность выражаю к.х.н. Трибуловичу В.Г. за помощь в оформлении диссертационного исследования, освоении методов молекулярного моделирования. Автор также признателен коллективу научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная фармакология» СПбГТИ(ТУ) за помощь в проведении работ по тематике диссертационного исследования, а также участие в совместных публикациях.

Диссертационная работа выполнена при поддержке следующих грантов:

РНФ: «Направленное конструирование селективных индукторов апоптоза для лечения онкологических заболеваний» (проект № 16-13-10358).

РНФ: «Мультитаргетный рациональный дизайн низкомолекулярных противораковых препаратов» (проект № 19-73-10150).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 Обзор литературы приведена характеристика рассматриваемых интерактантов – белка-онкогена Mdm2 и проапоптотического белка p53. Указана роль данных белков в процессах нормальной жизнедеятельности, а также при канцерогенезе. Охарактеризована фармакологическая значимость белка-онкогена Mdm2 как мишени для низкомолекулярных ингибиторов, стимулирующих p53-зависимый процесс клеточной смерти злокачественных новообразований. Представлено описание существующих низкомолекулярных ингибиторов, где рассмотрены особенности дизайна, описывающие наиболее оптимальную модель соединения, аффинного к p53-связывающей полости белка-онкогена Mdm2.

Особое внимание уделено наличию в структуре N-концевого домена белка Mdm2, малоизученного подвижного интерфейса, оказывающего влияние на уровень сайтоспецифичности низкомолекулярных ингибиторов. Описан ряд работ, затрагивающих тематику изучения динамики данного подвижного интерфейса. Акцентируется внимание на необходимости учёта лиганд-белковых взаимодействий с данным участком N-концевого домена белка Mdm2. В дальнейшем, структура белка Mdm2, где присутствует структура подвижного интерфейса, обозначена как Mdm2N.

В главе 2 Материалы и методы дано краткое описание используемых вычислительных методов: молекулярной динамики, ускоренной молекулярной динамики и метадинамики. Описан математический аппарат метода. В данной главе представлено практическое обоснование выбора вычислительных методов со ссылкой на ранее опубликованные работы, затрагивающие данную тематику. В главе указано, что метод молекулярной динамики (МД) используется для симуляции динамики лиганд-белковых комплексов с целью описания и параметризации условий, необходимых для дифференцировки влияния лиганда на динамику конформационно лабильного участка N-концевого домена белка-онкогена Mdm2. Однако из литературных данных установлено, что для рассматриваемого фрагмента белка событие доменного движения разрешено в пределах микросекунд, что для традиционной МД крайне большой интервал времени (масштаб микросекунд - миллисекунд), требующий ресурсоёмких вычислений (Pantelopulos et al., 2015). Таким образом, для подобного рода расчётов применяются модификации метода МД с вводом «ускоряющих» потенциалов и параметров.

В работе сделан акцент на использование метода молекулярной метадинамики, позволяющего проводить симуляцию динамики лиганд-белковых комплексов в жидких средах, благодаря применению оптимально генерализованного силового поля OPLS3e (Harder et al., 2016). Данный метод допускает ввод потенциала смещения, позволяющего покрыть более широкий временной интервал симуляции в диапазоне до микросекунд (Hansen et al., 2010).

Анализ траекторий динамики петли N-концевого домена белка-онкогена Mdm2 в комплексе с низкомолекулярными ингибиторами проводился в среде программного обеспечения Schrodinger Suite. Все расчёты были проведены в нескольких повторностях с целью установить статистическую достоверность наблюдаемых в динамике событий. Используемое ПО Schrodinger Suite позволяет в полной мере провести контроль качества проводимых симуляций, а также осуществить анализ событий, регистрируемых в процессе динамики с последующим выводом стандартизованного отчёта.

Расчёты молекулярной динамики петли N-концевого домена белка-онкогена Mdm2 в комплексе с низкомолекулярными ингибиторами проведены на базе серверов на основе процессоров Intel Xeon E54620 и 2x Intel Xeon Gold 6138 и графических карт Nvidia: Tesla K20c, Tesla P100 и GTX1080Ti.

В главе 3 Метадинамика комплексов белка MDM2N с активными ингибиторами описаны процедуры подготовки молекулярных систем к симуляции молекулярной динамики. Детально описаны все операционные протоколы, условия симуляции молекулярной метадинамики. Описано также обоснование выбора коллективных переменных (CV), которые необходимы для соотнесения с параметром свободной энергии системы, используемого для построения поверхностей свободной энергии, описывающих спектр конформационных переходов и приоритетные состояния, ассоциируемые с локальными и абсолютными минимумами. Стоит обратить внимание, что выбор величин коллективных переменных (CV) обоснован анализом экспериментально разрешённых моделей структуры белка-онкогена, где присутствует петля N-концевого домена (1-20 ак) и дифференцированы «открытое» и «закрытое» состояния белка (рисунок 1).

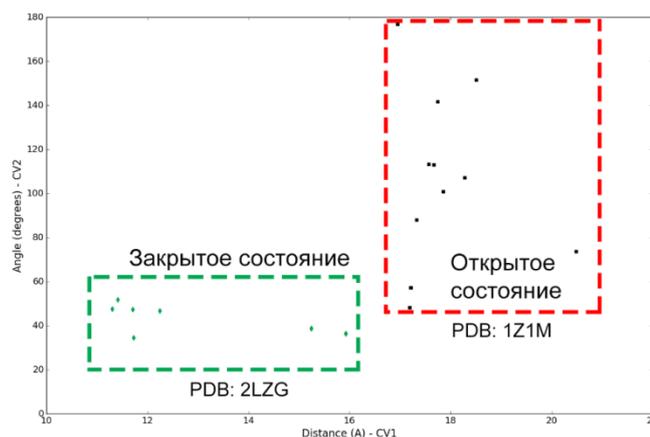


Рисунок 1 Показания подобранных коллективных переменных (CV) дифференцирующие «открытую» и «закрытую» формы белка Mdm2N; измерения проведены на экспериментально разрешённых моделях белка Mdm2 с представленной структурой петли N-концевого домена.

С целью валидации вычислительных моделей проведён ряд симуляций с белком в свободной форме, а также в комплексе с рядом структур, обладающих экспериментально разрешённой сайтоспецифичностью в отношении Mdm2 и, что немаловажно, – способные вызывать лиганд-индуцированное формирование «закрытой» конформации.

В качестве контрольной структуры был выбран ингибитор Pip-2, относящийся к классу пиперидинов [Michelsen et al., 2012], описывающей процесс лиганд-индуцированного формирования «закрытой» формы Mdm2. Помимо этого, в качестве экспериментально активных соединений выбран ряд ингибиторов на основе следующих скаффолдов: имидазольный (в двух вариантах), спироиндолиноновый и бензодиазепиновый.

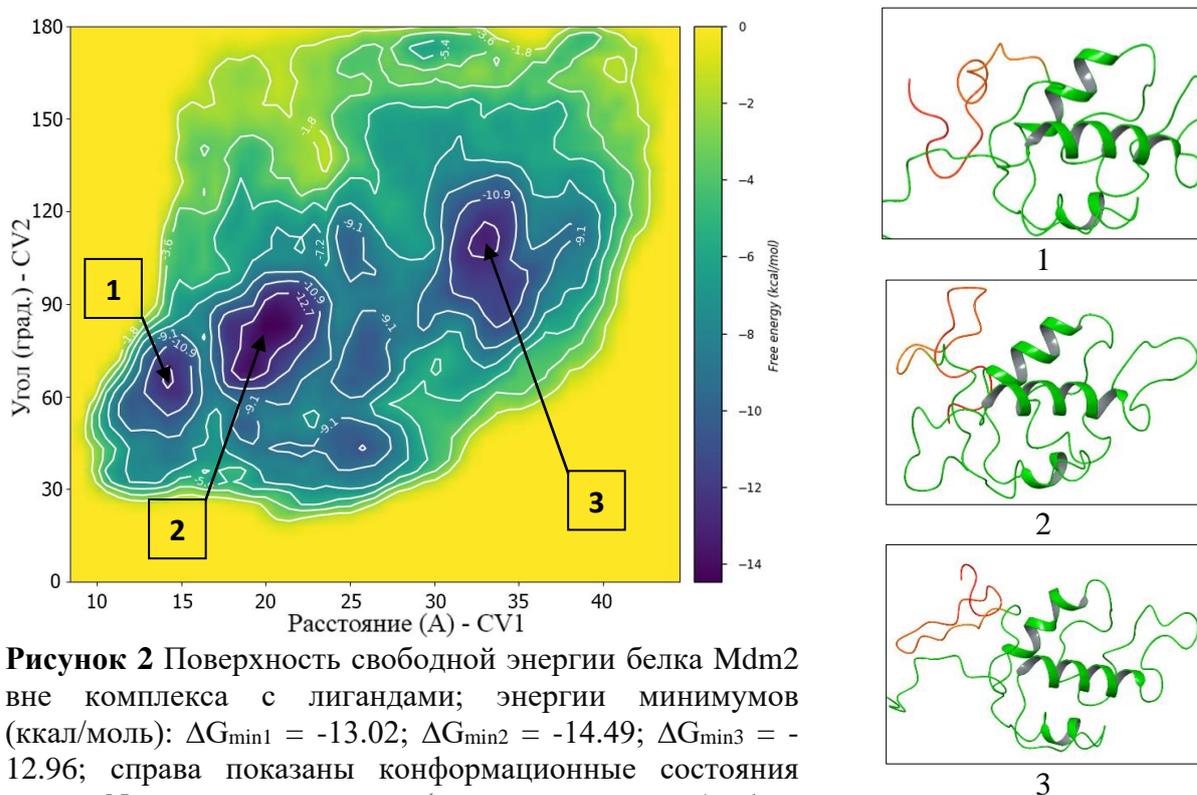


Рисунок 2 Поверхность свободной энергии белка Mdm2 вне комплекса с лигандами; энергии минимумов (ккал/моль): $\Delta G_{\min 1} = -13.02$; $\Delta G_{\min 2} = -14.49$; $\Delta G_{\min 3} = -12.96$; справа показаны конформационные состояния петли N-концевого домена (выделена красным); 1 – частично «закрытое», 2 – промежуточное, 3 – полностью «открытое»

Результирующие данные проведённых симуляций показали, что за период в 100 наносекунд белок Mdm2 в свободной форме существует в равновесии между «открытой» и «закрытой» формой. Однако, согласно уровню свободной энергии, предпочтительным является промежуточное состояние, при котором р53-связывающая полость в полной мере не перекрывается N-концевым доменом (рисунок 2).

Симуляция динамики Mdm2 в комплексе с ингибитором Pip-1 в идентичных условиях показала смещение конформационного состояния системы в сторону «закрытой» формы, с формированием единого абсолютного минимума. При этом анализ интенсивности лиганд-белковых взаимодействий показал расширение сети гидрофобных контактов с петлёй N-концевого домена в области аминокислот Ser7 и Pro9. Стоит также обратить внимание на сильное понижение уровня свободной энергии системы, что говорит об энергетической выгодности как самого лиганд-белкового комплекса, так и процесса перехода в «закрытое» состояние, поскольку абсолютный минимум энергии локализован в координатах CV соотносимых с данным состоянием (рисунок 3). Таким образом, была валидирована вычислительная модель, описывающая процесс лиганд-индуцированного перехода петли N-концевого домена Mdm2 в «закрытое» состояние, так как данное событие экспериментально было подтверждено методом спектроскопии ЯМР и опубликовано в базе данных RCSB PDB (модель 2LZG).

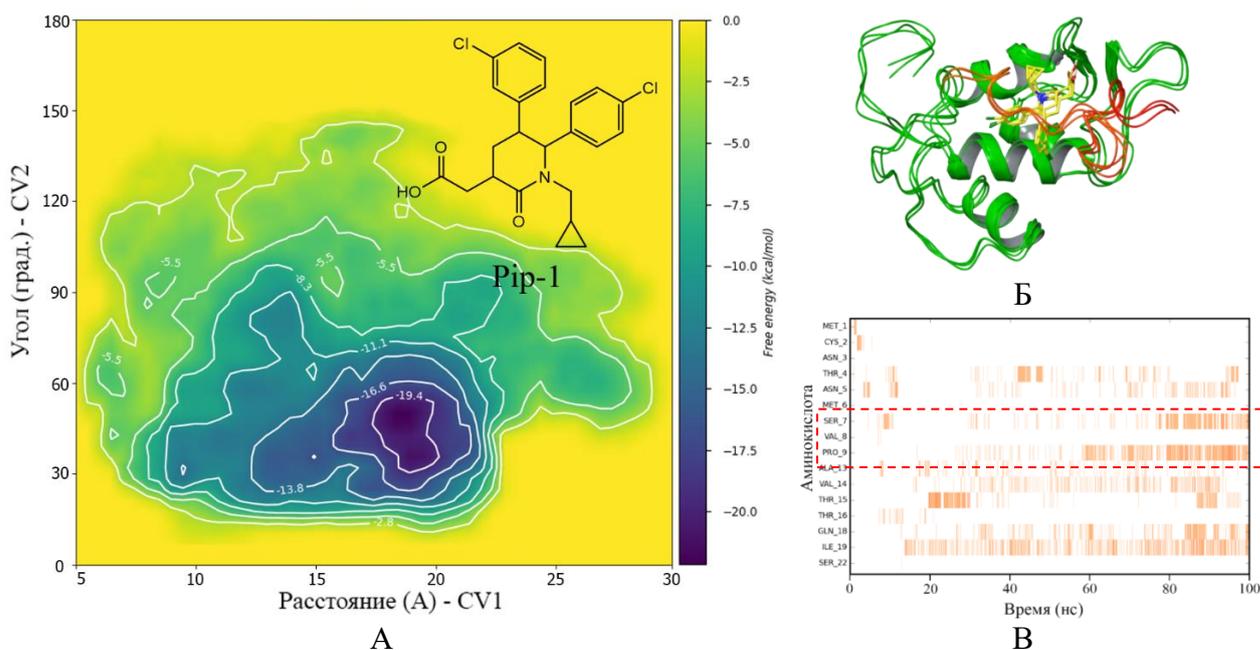


Рисунок 3 А - поверхность свободной энергии Mdm2N в комплексе с пиперидиновым ингибитором; Энергия минимума $\Delta G_{\min} = -20.54$ ккал/моль; Б – «закрытое» состояние комплекса; В - диаграмма интенсивности контактов в области петли N-концевого домена

Опираясь на полученные данные, проведён ряд симуляций молекулярной метадинамики для других, не менее активных низкомолекулярных ингибиторов белка онкогена Mdm2. Лиганды были помещены в р53-связывающую полость Mdm2, петля N-концевого домена находится в «открытом» состоянии. Рассмотрены соединения (рисунок 4): **1** – ингибитор Pip-1 (пиперидиноны), **2** - Nutlin-3a (имидазолы), **3** - RO5499252 (спироиндолиноны), **4** - VzD (бензодиазепин), **5** - RG7112 (модифицированный имидазол). Для каждой структуры проведена симуляция динамики, длительностью 100 наносекунд.

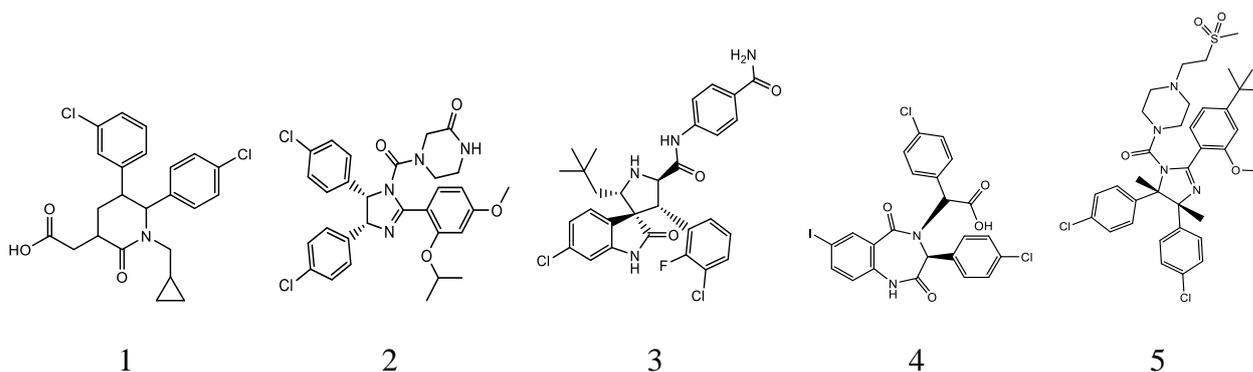


Рисунок 4 Структуры исследуемых ингибиторов белка-онкогена Mdm2

Анализ энергии симулируемых систем на основе структур **2-5** (рисунок 4) (структура **1** рассмотрена ранее и выступает в качестве контроля), а также событий, развивающихся в ходе динамики, показал, что все лиганды способны взаимодействовать с подвижной петлёй N-концевого домена. При этом свободная энергия (ΔG) всех лиганд-белковых комплексов ниже, чем у белка в свободной форме. Анализ динамики лиганд-белковых контактов показал наличие дополнительных гидрофобных контактов с петлёй N-концевого домена, наиболее часто – с Val8, Pro9 (таблица 2). Таким образом, установлено, что исследуемые активные ингибиторы Mdm2 имеют сродство не только к p53-связывающей полости, но и к конформационно вариабельному участку в N-концевом домене. При этом все рассмотренные комплексы перешли в «закрытое» состояние, которое совпадает с абсолютным минимумом энергии.

Таблица 2 Свободная энергия ΔG систем на основе белка Mdm2 в свободной форме и с ингибиторами **1-5**, регистрируемые взаимодействия с петлёй N-концевого домена

| Лиганд | ΔG_{\min} | $\Delta\Delta G$ | Значимое гидрофобное взаимодействие с N-кд. | Значимая водородная связь |
|----------------------|-------------------|------------------|---|---------------------------|
| нет | -14.49 | - | - | - |
| Pip-1 (1) | -20.54 | -6.05 | Ser7, Pro9, Ile19 | Thr16, Gln18, Ile19 |
| Nutlin-3a (2) | -18.01 | -3.52 | Val8, Pro9 | Ser7, Gln18 |
| RO5499252 (3) | -19.73 | -5.24 | Pro9 | - |
| Bzd (4) | -19.89 | -5.40 | Met6, Val8, Pro9, Ile19 | Asn3, Val14, Thr15 |
| RG7112 (5) | -19.40 | -4.91 | Val8, Pro9 | - |

В главе 4 **Метадинамика комплексов белка MDM2N с малоактивными ингибиторами** описана серия симуляций молекулярной метадинамики систем, включающих малоактивное соединение **6** и неактивное **7** (рисунок 5). Последнее является базовой частью активного соединения **2**, и вписывается в рамки фармакофорной гипотезы ингибиторов белка Mdm2. Приведены результаты анализа траекторий, описывающие ключевые изменения в системах. Проведена валидация вычислительной модели на примере малоактивного соединения имидазольного ряда – Nutlin-3b (**6**). Данное соединение является энантиомером структуры **2**. Уровень аффинности рассматриваемой структуры к Mdm2 в 200 раз ниже.

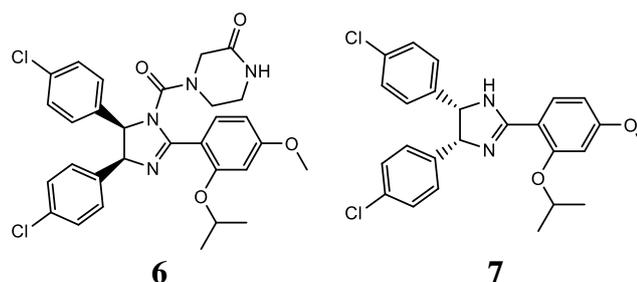


Рисунок 5 Структуры малоактивного и неактивного соединений, используемые для симуляции молекулярной метадинамики комплексов с белком Mdm2

Поверхность свободной энергии рассмотренных лиганд-белковых комплексов за период симуляции в 100 наносекунд показали наличие множества локальных минимумов в обеих системах (рисунок 6). При этом все они находятся в области переходного состояния системы между «открытым» и «закрытым» состояниями. Стоит также отметить, что показатели свободной энергии ΔG рассматриваемых систем сравнимы по уровню с энергией системы на основе белка Mdm2N без ингибиторов (таблица 2). Тем не менее, стоит учесть, что соединение **6** обладает аффинностью к белку Mdm2 и поэтому в симуляции регистрируется «закрытое» состояние структуры белка Mdm2N, но согласно показателю свободной энергии ΔG данное состояние энергетически невыгодно. Тем не менее, малоактивный лиганд **6**, в отличие от активного энантиомера, не реализует гидрофобных контактов с петлёй N-концевого домена.

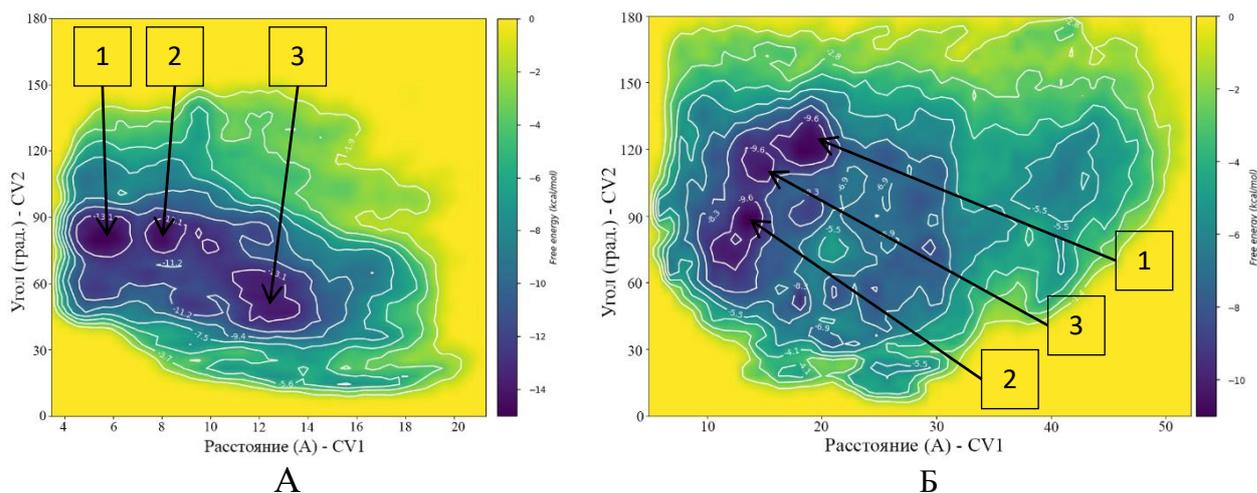


Рисунок 6 А – поверхность свободной энергии белка Mdm2N в комплексе с **6**; Энергии минимумов (ккал/моль): $\Delta G_{\min 1} = -14.86$; $\Delta G_{\min 2} = -14.50$; $\Delta G_{\min 3} = -13.06$.; Б – в комплексе с **7**, $\Delta G_{\min 1} = -11.03$; $\Delta G_{\min 2} = -10.86$; $\Delta G_{\min 3} = -9.96$

Таблица 3 Уровень свободной энергии систем на основе белка Mdm2 в свободной форме и с лигандами **6**, **7**; значимые регистрируемые взаимодействия с петлёй N-концевого домена

| Лиганд | ΔG_{\min} | $\Delta \Delta G$ | Значимое гидрофобное взаимодействие с N-кд. | Значимая водородная связь |
|----------|-------------------|-------------------|---|---------------------------|
| - | -14.49 | 0 | Не обнаружено | Не обнаружено |
| 6 | -14.86 | -0.37 | Не обнаружено | Thr4, Asn5 |
| 7 | -11.03 | +3.46 | Не обнаружено | Не обнаружено |

В Главе 5 Метадинамика при точечных мутациях в структуре белка MDM2N описаны результаты вычислительного эксперимента, где в структуре петли N-концевого домена выполнен ввод точечных мутаций в 8, 9 положении, а также их сочетание. Все эксперименты проводились на модели лиганд-белкового комплекса Mdm2N с лигандом **2**. Для каждой структуры проведена симуляция метадинамики длительностью 100 наносекунд с регистрацией свободной энергии в координатах коллективных переменных, установленных в главе 3. Результирующие поверхности свободной энергии рассмотренных систем показали, что ввод точечных мутаций в структуру петли N-концевого домена приводит к смещению конформационного равновесия всех систем в сторону «открытой» конформации белка Mdm2N (рисунок 7). При этом во всех случаях также наблюдается существенный рост свободной энергии ΔG системы (таблица 4).

Таблица 4 Уровень свободной энергии ΔG исследуемых систем на основе Mdm2; значимые регистрируемые взаимодействия с петлёй N-концевого домена

| Комплекс | ΔG_{\min} | $\Delta \Delta G$ | Значимое гидрофобное взаимодействие с N-кд. | Значимая водородная связь |
|-----------|-------------------|-------------------|---|---------------------------|
| - | -14.49 | 0 | - | - |
| 6 | -18.01 | -3.52 | Val8, Pro9 | Ser7, Gln18 |
| V8A+6 | -11.38 | +3.11 | - | - |
| P9A+6 | -11.20 | +3.29 | Ala13 | Cys2, Thr4, Ala13 |
| V8A+P9A+6 | -12.30 | +2.19 | Met1, Met6, Cys2 | Cys2, Asn3 |

Взаимодействие с петлёй N-концевого домена во всех проведённых симуляциях минимально. Мутуруемый участок (8 и 9 положение) исключен из взаимодействия. Как следствие – дестабилизируется взаимодействие с петлёй N-концевого домена, наблюдается рост общей энергии системы.

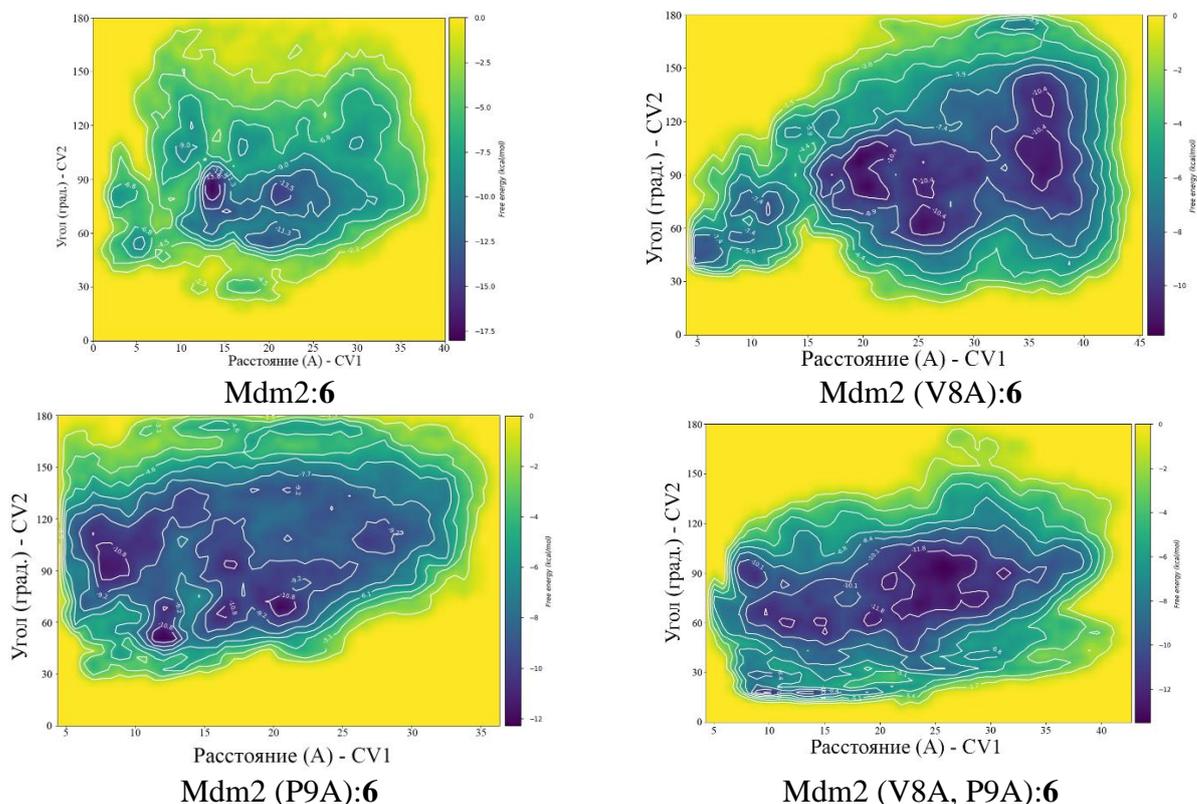


Рисунок 7 Поверхности свободной энергии систем на основе комплекса Mdm2:6 без мутаций и при их наличии

Таким образом, взаимодействие с Val8/Pro9 в контексте лиганд-белкового взаимодействия с белком Mdm2N является фактором, повышающим энергетическую выгодность «закрытой» формы комплекса.

В главе 6 Учет подвижного интерфейса петли N-концевого домена при дизайне ингибиторов белка-онкогена MDM2 описана серия работ и экспериментов по выделению новых низкомолекулярных ингибиторов белка Mdm2. Анализ химического пространства малых молекул – ингибиторов белка-онкогена Mdm2 показал, что факт формирования «закрытой» формы лиганд-белкового комплекса полностью описан для серии пиперидиновых ингибиторов. Следовательно, наиболее актуальным будет применение виртуальной библиотеки структур, фармакофорно наиболее близких к данному классу структур. В итоге была подобрана библиотека на основе вариаций пяти скаффолдов, описанных на рисунке 8. Рассматриваемые скаффолды схожи с таковыми, использованными в ингибиторах взаимодействия Mdm2-p53 на основе пиперидин-2-она и морфолин-3-она.

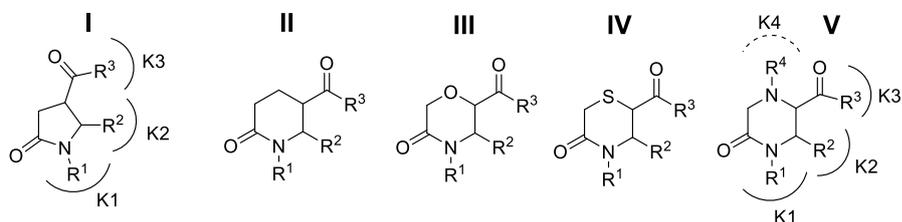


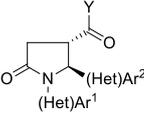
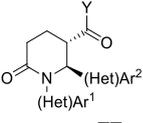
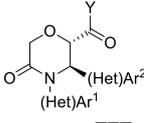
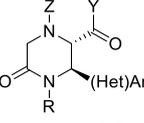
Рисунок 8 Пять вариантов скаффолдов (I-V), использованных для подбора ингибиторов белка-онкогена Mdm2; K1-K3 – обозначение гидрофобных карманов, заполняемых аминокислотными остатками p53 (Phe19, Trp23, Leu26).

Объем виртуальной библиотеки структур оказался избыточным, поэтому был проведен предварительный отсев виртуальных соединений с использованием специфических фильтров:

1. ограничение по базовым параметрам, наиболее характерным для низкомолекулярных ингибиторов белка-онкогена Mdm2, на основе анализа литературных источников;
2. наличие гиперэффинных к белкам групп и их сочетаний (включая PAINS);
3. стерический контроль геометрии лигандов (установление максимального размера лиганда в полости, согласно фармакофору).

Подбор потенциально активных молекул проводился на основе результатов докинга. Результаты докинга оценивались как по численным показателям сродства (скоринг-функции), так и визуально, исходя из условия воспроизведения укладки референсного лиганда **6** (Nutlin-3a). Из 91 соединения, прошедшего отбор, было выбрано 38 наиболее подходящих по критерию синтетической доступности (доля участия вариантов скаффолдов указана в таблице 5). Тестирование целевой активности приоритетных структур проводилось на клетках HCT116 с положительным статусом белка p53 дикого типа. В качестве контроля использованы наиболее активные ингибиторы Mdm2: **6** (Nutlin-3a) и MI-77301 (не показан). Тестирование биоактивности проводилось с помощью метода проточной цитометрии при концентрации соединений 5 мкмоль/л. В качестве стопроцентного уровня индукции апоптоза взято воздействие **6** (Nutlin-3a). Эффект запуска апоптоза от второго соединения (MI-77301) выше, что подтверждается литературными данными (таблица 6).

Таблица 5 Распределение скаффолдов по выборке лидирующих соединений

| Скаффолд |  <i>trans-I</i> |  <i>trans-II</i> |  <i>trans-III</i> |  <i>trans-V</i> |
|---------------------|---|--|---|---|
| Количество структур | 9 | 3 | 23 | 3 |

Таким образом, активность 38 исследуемых соединений нормализована по отношению к активности соединения **6**. Из 38 исследованных соединений 9 показали приемлемый уровень активности (более 50% от того, что показало соединение **6**).

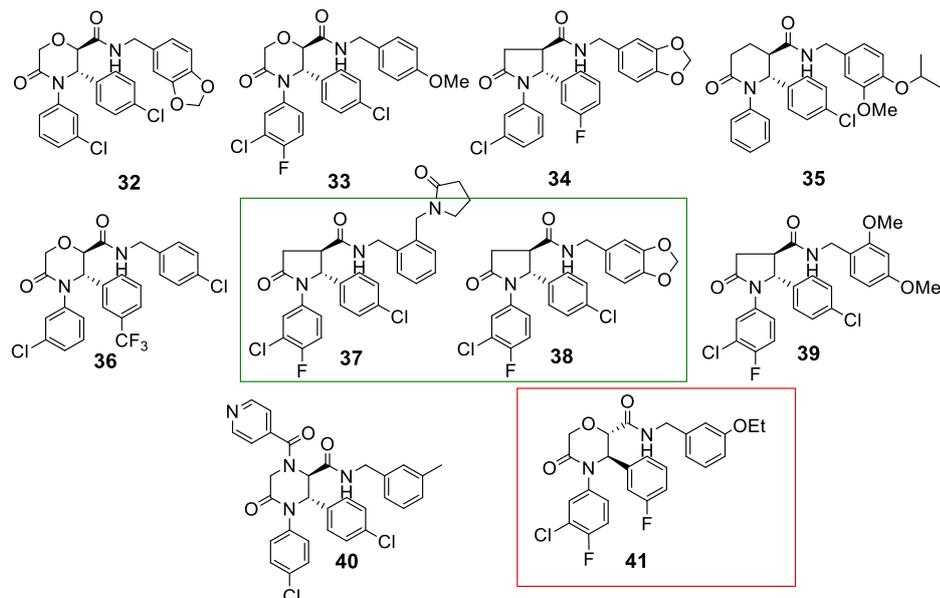


Рисунок 9 Ингибиторы взаимодействия белков Mdm2-p53, структуры **37** и **38** – наиболее активные индукторы апоптоза, соединение **41** – неактивное

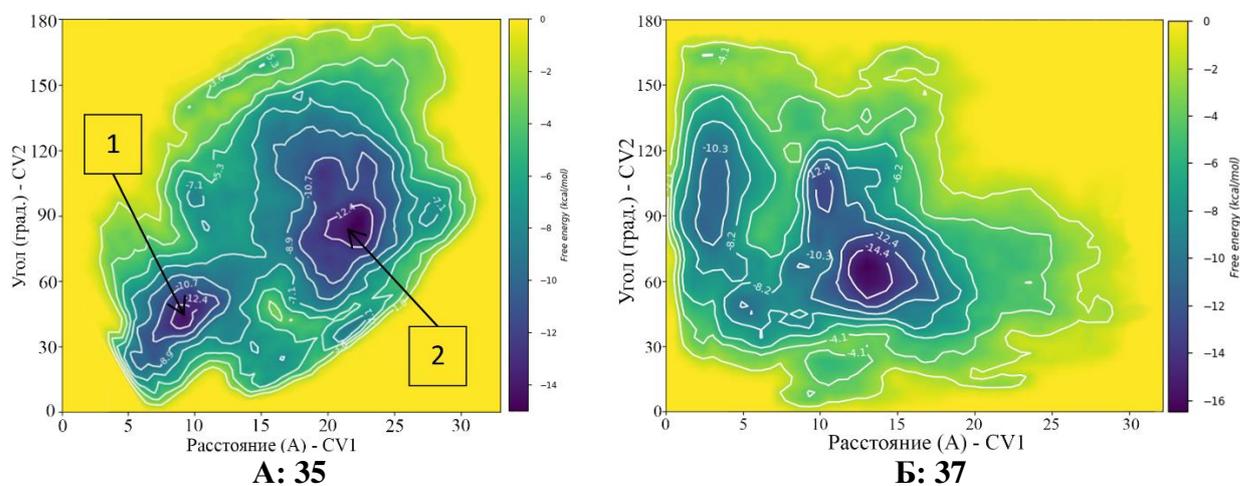
Таблица 6 Показатели p53-опосредованного апоптоза клеток НСТ116-WTrp53+ и уровня флуоресценции клеток человеческой остеосаркомы p53+ U2OS при добавлении 5 мкмоль/л (нормализовано относительно контроля по Nutlin-3a (**6**), принятого за 100%)

| № | MW | GoldScore | Апоптоз (%) | Уровень флуоресценции (p53+EGFP) |
|-----------------|-------|-----------|-------------|----------------------------------|
| 6 | 581.5 | 62.9 | 100.0 | 100.0 |
| MI-77301 | 562.5 | 64.7 | 115.0 | 134.0 |
| 32 | 498.1 | 65.3 | 66.5 | 58.2 |
| 33 | 502.1 | 62.1 | 85.3 | 76.2 |
| 34 | 466.1 | 63.7 | 79.5 | 68.5 |
| 35 | 506.2 | 63.4 | 69.1 | 50.6 |
| 36 | 522.1 | 63.2 | 84.6 | 91.2 |
| 37 | 553.1 | 66.8 | 123.9 | 111.8 |
| 38 | 500.1 | 67.0 | 90.7 | 114.3 |
| 39 | 516.1 | 66.9 | 75.0 | 62.1 |
| 40 | 572.1 | 61.7 | 63.4 | 44.0 |
| 41 | 500.1 | 69.6 | 1.6 | 0.0 |

Из 38 виртуальных хитов, аффинных в отношении белка Mdm2, экспериментально разрешённую биологическую активность проявили 9, среди которых 2 – более активные, чем соединения **6** и **MI-77301** из контрольной группы (рисунок 9 и таблица 6). Учитывая тот факт, что рассматриваемые соединения отобраны согласно результатам докинга с ограниченной и полноразмерной моделями белка Mdm2, необходимо установить, насколько вероятно их взаимодействие с петлёй N-концевого домена, ранее не включаемого в структуру сайта связывания белка p53, так как при испытаниях на клеточных культурах ингибиторы взаимодействуют с полноразмерным белком Mdm2, содержащим полноценную структуру петли N-концевого домена.

В главе 7 Динамика комплексов экспериментально отобранных ингибиторов описывается серия симуляций молекулярной метадинамики высокоактивных соединений с моделью белка Mdm2, включающей полноразмерный N-концевой домен. Для расчёта динамики лиганд-белковых комплексов выбраны три активные структуры из девяти ранее отобранных в ходе экспериментов, проведённых в главе 6. Первые две – **37** и **38**, с наивысшим уровнем активности. Третья структура – **35**, с умеренными показателями индукции апоптоза (на уровне 50% от контрольного соединения **6**).

Лиганд-белковые комплексы с белком Mdm2N построены методом молекулярного докинга, системы для симуляции метадинамики созданы в условиях, идентичных ранее проведённым экспериментам. За период в 100 наносекунд для каждого комплекса зарегистрирована поверхность свободной энергии ΔG , привязанная к координатам контрольных величин (CV), описывающих конформационное состояние белка.



Энергии минимумов (ккал/моль):

$$\Delta G_{\min 1} = -14.20; \Delta G_{\min 2} = -14.22$$

$$\Delta G_{\min 1} = -16.41$$

Рисунок 10 Поверхность свободной энергии лиганд-белковых комплексов Mdm2N с исследуемыми соединениями **35** и **37**

Комплекс белка Mdm2N с умеренно активным соединением **35** в динамике демонстрирует наличие двух разделённых, эквивалентных по энергии минимумов (рисунок 10, А). Первый соответствует «закрытой» форме лиганд-белкового комплекса. Второй – «открытому» состоянию структуры белка Mdm2, где петля N-концевого домена ориентирована в окружающее пространство. Переход между минимумами возможен при повышении свободной энергии ΔG системы до -7.1 ккал/моль. Исходя из значений ΔG первого и второго минимумов, умеренно активное соединение удерживает систему в равновесном состоянии, где сосуществуют вместе «открытая» и «закрытая» форма белка

Mdm2N. Данная система по модели поведения схожа с лиганд-белковым комплексом Mdm2N с соединением **6 (Nutlin-3b)**.

Более активное соединение **37** в комплексе с Mdm2N снижает конформационную лабильность системы, формирует одиночный минимум энергии, однако, согласно параметрам CV, данное состояние является промежуточным (рисунок 10, Б). Однако стоит обратить внимание, что уровень свободной энергии системы снизился в среднем на 2.2 ккал/моль. Снижение уровня свободной энергии системы говорит об энергетической выгодности лиганд-белкового комплекса. Данный факт также согласуется с более высоким уровнем целевой активности ингибитора **37** в экспериментах, проведённых ранее.

Проведена симуляция метадинамики лиганд-белкового комплекса Mdm2N и соединением **38**, лидером по уровню реактивации функции белка p53, в сравнении с лигандами **37** и **35**. Поверхность свободной энергии комплекса показывает энергетически выгодное развитие события перехода к «закрытой» конформации белка Mdm2N. В процессе симуляции достигается более глубокий минимум энергии в области, соответствующей «закрытой» форме (рисунок 11). Общая энергия системы становится ниже, но в данном случае. Разница не настолько существенна: $\Delta\Delta G$ абсолютных минимумов энергии соединений **37** и **38** составляет лишь 0.17 ккал/моль. Минимум энергии по показателям CV соответствует полностью «закрытому» положению петли N-концевого домена.

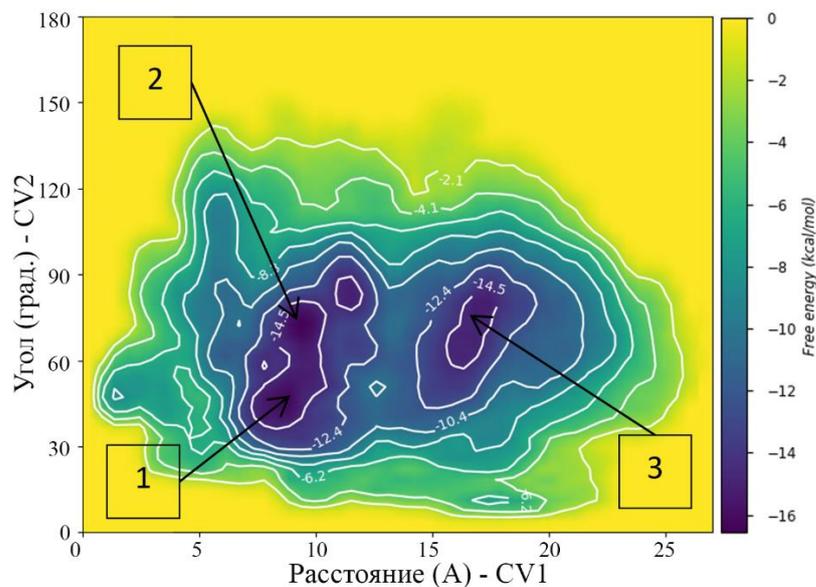


Рисунок 11 Поверхность свободной энергии лиганд-белкового комплекса Mdm2N:**38**; энергии минимумов (ккал/моль): $\Delta G_{\min 1} = -15.83$; $\Delta G_{\min 2} = -16.58$; $\Delta G_{\min 3} = -15.22$

Анализ интенсивности и типов лиганд-белковых контактов соединений **35**, **37** и **38** показал, что с ростом активности исследуемых малых молекул совпадает и развитие интенсивности гидрофобных лиганд-белковых контактов с Mdm2 и, в частности, с петлёй N-концевого домена. На рисунке 12 показана динамика интенсивности лиганд-белковых контактов, где её рост наблюдается в ряду соединений **35**<**37**<**38**. Стоит обратить внимание, что соединение **35**, как умеренно активное, показывает низкий общий уровень интенсивности гидрофобных контактов (рисунок 12, А, справа). В динамике интенсивность контактов лиганда **35** с петлёй N-концевого домена растёт к концу симуляции (рисунок 12, А, слева).

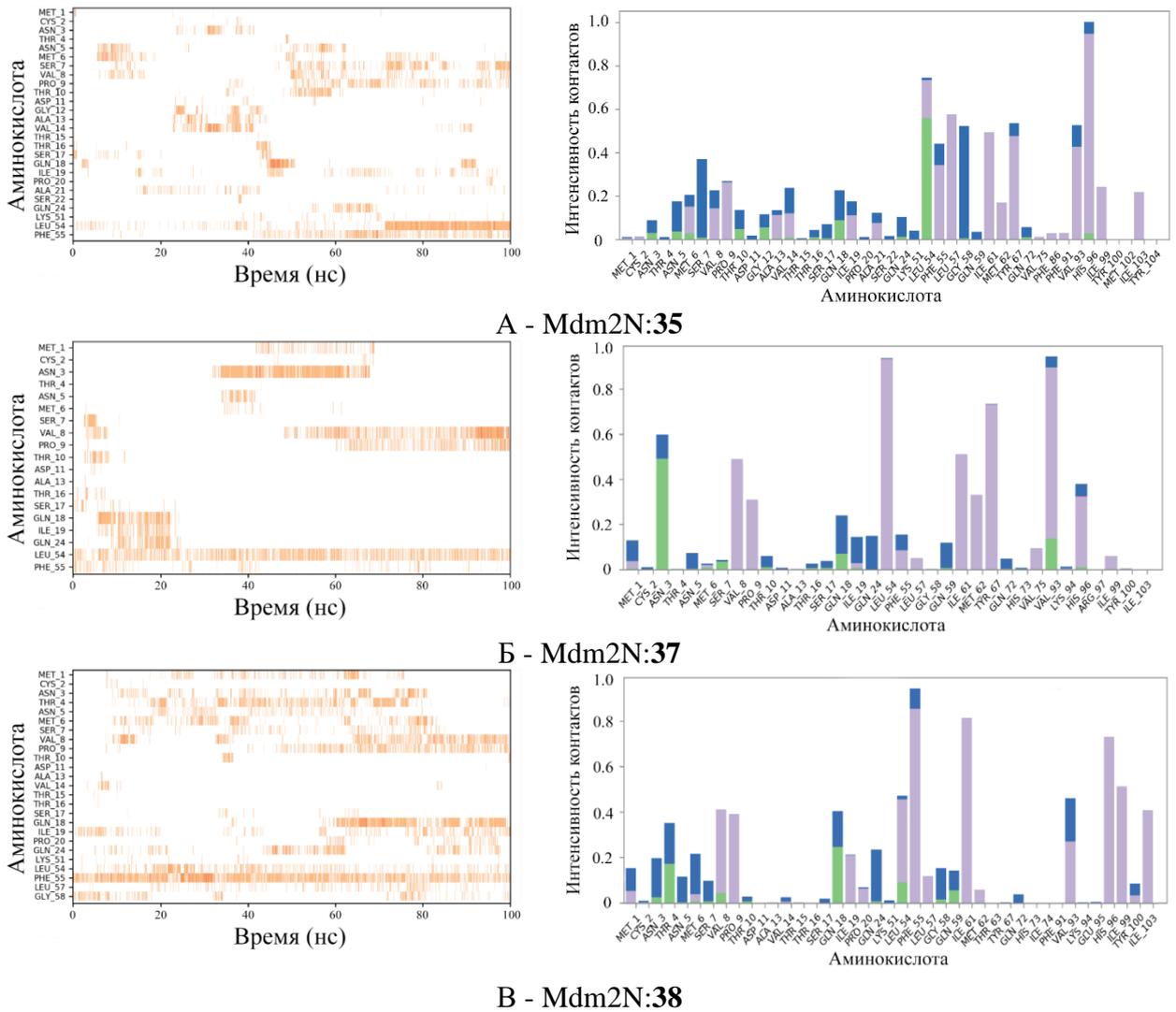


Рисунок 12 Динамика и интенсивность лиганд-белковых контактов с р53-связывающим сайтом Mdm2, включая петлю N-концевого домена

У более активных соединений **37** и **38** повышена интенсивность гидрофобных контактов, а также их количество (рисунок 12, Б и В).

Для сравнения была проведена также симуляция молекулярной метадинамики соединения из серии низкоактивных, в данном случае – соединение **41**. В отличие от исследованных ранее лигандов **37** и **38**, данная структура не подавляет р53-связывающую активность белка Mdm2 и не вызывает реактивации функции белка р53 с последующим развитием апоптоза, что говорит об отсутствии взаимодействия с Mdm2. При этом соединение **41** соответствует фармакофорным характеристикам актуальных ингибиторов белка Mdm2, имеет идентичный остальным показатель расчётного средства GoldScore и укладку в активном сайте.

Проведённая симуляция метадинамики комплекса белка Mdm2N с соединением **41** показала, что реализованный лиганд-белковый ансамбль энергетически невыгоден. Рассчитанная в ходе симуляции поверхность свободной энергии ΔG (рисунок 13) демонстрирует наличие единого абсолютного минимума, который, согласно параметрам CV, относит систему к «открытому» конформационному состоянию N-концевого домена белка Mdm2. Общий уровень энергии системы значительно выше, чем у соединений **37**,

38 и 35. Таким образом, расчёт метадинамики говорит об энергетической невыгодности существования лиганд-белкового комплекса Mdm2N с соединением **41**.

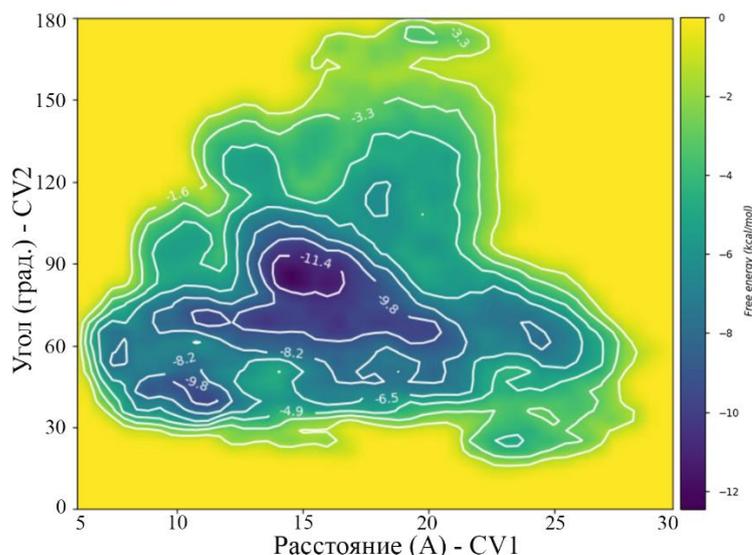
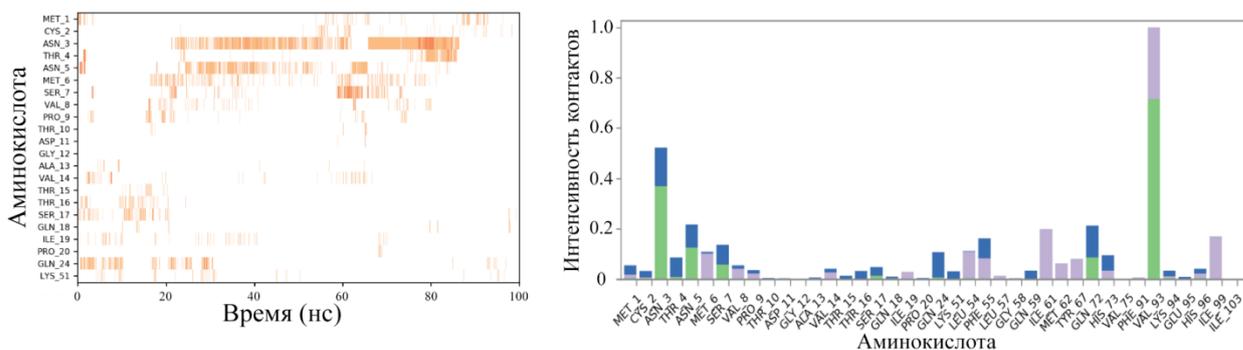


Рисунок 13 Поверхность свободной энергии лиганд-белкового комплекса Mdm2N с лигандом **41**; энергия минимума (ккал/моль): $\Delta G_{\min 1} = -12.76$

Анализ временной развёртки динамики лиганд-белковых контактов показывает, что соединение **41** взаимодействует с петлёй N-концевого домена в области Asn3 посредством водородной связи. Взаимодействие нестабильное и прекращается со временем симуляции. Сеть гидрофобных контактов не развивается (рисунок 14). С основной частью Mdm2N соединение **41** взаимодействует слабо, не превышая 20% от общего времени симуляции. Из полученных данных следует, что лиганд покидает сайт связывания.



Mdm2N:41

Рисунок 14 Динамика и интенсивность лиганд-белковых контактов с p53-связывающим сайтом белка Mdm2, включая петлю N-концевого домена

Закключение. В диссертационной работе установлен ряд новых закономерностей при изучении динамики, а также профиля свободной энергии для ингибиторов белка онкогена Mdm2 в свете присутствия петли N-концевого домена. Исследование молекулярной динамики комплексов убиквитин-Е3 лигазы Mdm2 с наиболее представительными ингибиторами разных классов показали, что участок N-концевого домена в пределах с 1-й по 20-ю аминокислоту принимает участие в процессе комплексообразования с лигандами в p53-связывающей полости. При этом все системы, где реализуется данное событие, обладают более низким уровнем свободной энергии ΔG в сравнении с безлигандным белком (таблица 7, выделено зелёным).

Соединения, проявляющие нулевую или низкую экспериментальную аффинность к белку Mdm2, в симуляции динамики демонстрируют уровень свободной энергии ΔG больший, чем у свободной формы белка. Данный факт говорит об энергетической невыгодности построенного лиганд-белкового комплекса (таблица 7, выделено красным).

Все активные низкомолекулярные ингибиторы взаимодействуют с N-концевым доменом Mdm2 в области валина и пролина в восьмом и девятом положении, чем стабилизируют «закрытую» конформацию Mdm2. При этом переход в «закрытое» состояние сопровождается пошаговым взаимодействием с N-концевым доменом, где развивается сеть гидрофобных контактов с Val8 и Pro9.

Таблица 7 Разница энергий ΔG_{\min} в минимумах, стабилизированное конформационное состояние системы

| Комплекс Mdm2N: | Абсолютный минимум ΔG_{\min} (ккал/моль) | $\Delta \Delta G$ Между апо- и связанной формой | Состояние в абс. минимуме |
|--------------------|--|---|---------------------------|
| Апо- | -14.49 | 0 | откр |
| 27 | -20.54 | -6.05 | закр |
| 20 | -18.01 | -3.52 | закр |
| 29 | -19.73 | -5.24 | закр |
| 11 | -19.89 | -5.40 | закр |
| 30 | -19.40 | -4.91 | закр |
| 21 | -14.86 | -0.37 | откр |
| 31 | -11.03 | +3.46 | откр |
| V8A+ 20 | -11.38 | +3.11 | откр |
| P9A+ 20 | -11.20 | +3.29 | откр |
| V8A+P9A+ 20 | -12.30 | +2.19 | откр |
| 35 | -14.22 | +0.27 | закр |
| 37 | -16.41 | -1.92 | закр |
| 38 | -16.58 | -2.09 | закр |
| 41 | -12.76 | +1.73 | откр |

Проведённые расчёты показали, что динамика и профиль свободной энергии петли N-концевого домена белка Mdm2 может служить индикатором сайтоспецифичности исследуемых ингибиторов.

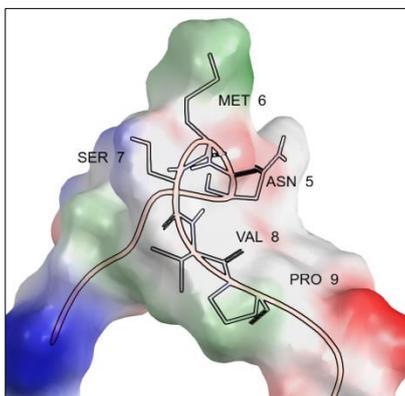
Гидрофобный характер лиганд-белкового взаимодействия с аминокислотами Val8 и Pro9 N-концевого домена белка Mdm2 позволяет расширить параметры фармакофорной гипотезы ингибиторов. Таким образом, возможен переход от трёхцентровой модели связывания к четырёхцентровой, что позволит существенно расширить пространство потенциально аффинных структур и оптимизировать существующие ингибиторы.

В работе проведён также анализ значимости очередности взаимодействий между лигандом, петлёй N-концевого домена белка Mdm2 и его р53-связывающей полостью. Для этого была проведена оценка общей характеристики гидрофобных свойств петли N-концевого домена, приведённая в таблице 22. Результаты позволяют предположить существование серии малых гидрофобных сайтов связывания. Показатель общей площади гидрофобной поверхности в петле N-концевого домена составляет 69% от величины р53-связывающего сайта, т.е. весьма значителен. Величина полной энергии гидрофобного взаимодействия и показатель её интенсивности на 55% ниже, чем в р53-связывающем сайте, что негативно влияет на вероятность полноценного связывания с лигандом.

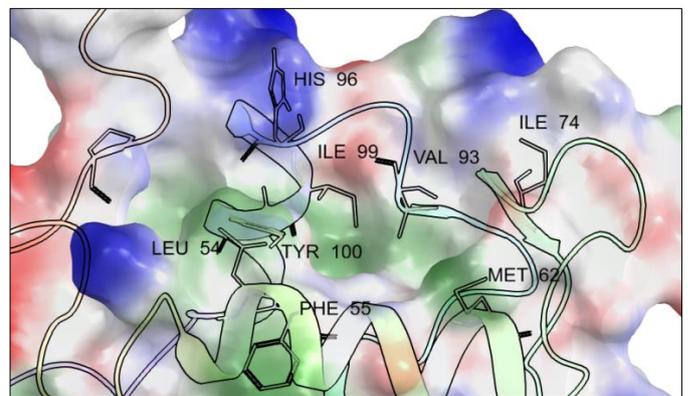
Таблица 8 Характеристики гидрофобной молекулярной поверхности белка Mdm2N в лиганд-связывающей области р53-связывающего сайта и петли N-концевого домена

| Аминокислота | Доступная неполярная поверхность (Å ²) | Энергетический вклад гидрофобного взаимодействия (ккал/моль) | Интенсивность гидрофобного взаимодействия (энергетический вклад/площадь сайта, ккал/моль·Å ²) | Доступность боковой цепи для растворителя (%) |
|--------------------------|--|--|---|---|
| Р53-связывающий сайт | | | | |
| Leu54 | 55.80 | 26.44 | 0.47 | 27.60 |
| Phe55 | 123.59 | 51.16 | 0.41 | 43.80 |
| Met62 | 82.23 | 25.14 | 0.31 | 33.60 |
| Ile74 | 39.86 | 22.66 | 0.57 | 28.60 |
| Val93 | 30.7 | 8.40 | 0.27 | 17.00 |
| Lys94 | 87.43 | 4.62 | 0.05 | 51.30 |
| His96 | 50.68 | 43.78 | 0.86 | 44.50 |
| Tyr100 | 25.39 | 23.97 | 0.94 | 20.70 |
| Итого | 495.68 | 206.17 | Средн.: 0.49 | Средн.:33.38 |
| Петля N-концевого домена | | | | |
| Met6 | 165.09 | 53.66 | 0.33 | 59.10 |
| Val8 | 49.40 | 16.62 | 0.34 | 34.70 |
| Pro9 | 101.59 | 14.51 | 0.14 | 51.70 |
| Ile19 | 28.91 | 9.66 | 0.33 | 18.50 |
| Итого | 344.99 | 94.45 | Средн.: 0.28 | Средн.:41.01 |

Ещё один отрицательный фактор, препятствующий полноценному удержанию лиганда исключительно в пределах N-концевого домена – пространственное расположение гидрофобных сайтов. На рисунке 15А показано, что боковые цепи аминокислот, формирующих гидрофобные интерфейсы, локализованы по разные стороны пептидной цепи. Так, гидрофобные зоны в области Met6 и Pro9 разнесены на 12.25 Å. Для сравнения, у соединения **20** расстояние между хлорфенильными фрагментами, реализующими гидрофобный контакт в р53-связывающем сайте, составляет 7.5 Å, а максимальный размер – 12.7 Å. В р53-связывающем сайте расположение зон гидрофобного контакта более плотное (рисунок 15 Б), что выражается в более высоком уровне интенсивности гидрофобного взаимодействия (таблица 8).



А



Б

Рисунок 15 Локализация зон гидрофобного (зелёный), электростатического положительного (синий) и отрицательного (красный) взаимодействий в области: А – петли N-концевого домена, Б - р53-связывающего сайта

С точки зрения пространственной ориентации гидрофобные зоны формируют глубокий карман, образуемый аминокислотами с максимальным вкладом в энергию гидрофобного взаимодействия: Leu54, Phe55, Met62, His96, Tyr100. Стоит также обратить внимание на то, что в большинстве случаев, помимо гидрофобного распознавания р53-связывающего сайта, ингибиторы взаимодействуют с заряженными участками His96 и Tyr100 (π -стекинг с галогенфенильными фрагментами большинства ингибиторов белка Mdm2).

Именно ввиду большей аттрактивности для ингибиторов взаимодействие с р53-связывающим сайтом считается первостепенным. Взаимодействие ингибитора с петлёй N-концевого домена, в свою очередь, является следствием лиганд-индуцируемого смещения конформационного равновесия комплекса в область более низких энергий. Тем не менее, проведённые расчёты динамики с вводом точечных мутаций показали, что полное отсутствие гидрофобного взаимодействия с петлёй N-концевого домена приводит к дестабилизации лиганд-белкового комплекса. Таким образом, гидрофобное взаимодействие лигандов р53-связывающей полости с аминокислотами Val8, Pro9 N-концевого домена белка Mdm2 является необходимым для стабильного перехода Mdm2 в связанную форму. Это обстоятельство отражается на уровне целевой активности ингибиторов белка-онкогена Mdm2 – индукции р53-зависимой гибели опухолевых клеток.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярная динамика модели белка Mdm2 с полной структурой подвижного интерфейса, локализованного на участке с 1-й по 20-ю аминокислоту, подтвердила наличие двух стабильных состояний – «открытого» и «закрытого»;
2. Расчёты молекулярной динамики позволили подтвердить, что подвижный интерфейс N-концевого домена белка Mdm2 существует преимущественно в «открытой» форме;
3. Расчёты молекулярной динамики белка Mdm2, содержащего подвижный интерфейс N-концевого домена, в комплексе с низкомолекулярным ингибитором Pir-1 отражают процесс лиганд-индуцируемого перехода от «открытого» в «закрытое» конформационное состояние, что согласуется с экспериментальными данными;
4. Впервые проведено моделирование динамики лиганд-индуцируемого перехода между «открытым» и «закрытым» конформационными состояниями для семи классов мишень-специфичных ингибиторов, разработанных без учёта присутствия подвижного интерфейса N-концевого домена;
5. С помощью моделирования показано, что аффинные к белку Mdm2 ингибиторы стимулируют переход в «закрытую» конформацию за счёт снижения уровня свободной энергии системы;
6. Ввод точечных мутаций в структуру подвижного интерфейса N-концевого домена доказывает значимость гидрофобного контакта ингибиторов с аминокислотами Val8 и Pro9;
7. С учётом модели подвижного интерфейса N-концевого домена подобраны новые ингибиторы белка-онкогена Mdm2 на основе пирролидин-2-онового скаффолда.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Гуреев М.А.** Разработка ингибиторов MDM4 и MDM2 / М.А. Гуреев, В.Г. Трибулович, П.Б. Давидович, Н.А. Барлев, А.В. Гарабаджиу, Д. Мелино // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12 – Вып. 2. – С. 25.
2. **Гуреев М.А.** Природные соединения как основа для создания модуляторов активности p53 / М.А. Гуреев, В.Г. Трибулович, П.Б. Давидович, А.В. Гарабаджиу // Известия АН. Серия химическая: специализированный выпуск. – 2014. – Т. 9 – С. 1963–1975.
3. Belyakov A. V. Determination of the molecular structure of gaseous proline by electron diffraction, supported by microwave and quantum chemical data / A. V. Belyakov, **М.А. Gureev**, A.V. Garabadzhiu, V. A. Losev, A. N. Rykov // Structural Chemistry. – 2015. – Vol 26 – p. 1489–1500.
4. Grigoreva T. A. Proapoptotic modification of substituted isoindolinones as MDM2-p53 inhibitors / T. A. Grigoreva, D. S. Novikova, A. V. Petukhov, **М. А. Gureev**, A. V. Garabadzhiu, G.Melino, N. A. Barlev, V. G. Tribulovich, // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2017. – Vol 27, №23. – P. 5197–5202.
5. Krasavin M. Y. Design, in silico prioritization and biological profiling of apoptosis-inducing lactams amenable by the Castagnoli-Cushman reaction / M. Krasavin, **М. А. Gureev**, D. Dar'in, O. Bakulina, M. Chizhova, A. Lepikhina, D. Novikova, T. Grigoreva, G. Ivanov, A. Zhumagalieva, A. V. Garabadzhiu, V. G. Tribulovich // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 26, № 9. – P. 2651–2673.
6. Grigoreva T. A. Amino acids as chiral derivatizing agents for antiproliferative substituted N-benzyl isoindolinones / T. A. Grigoreva, D. S. Novikova, **М. А. Gureev**, A. V. Garabadzhiu, V. G. Tribulovich // Chirality. – 2018. – Vol. 30, № 6. – P. 785–797.
7. **Gureev M. A.** Simulation of MDM2 N-terminal domain conformational lability in the presence of imidazoline based inhibitors of MDM2-p53 protein-protein interaction / M. A. Gureev, D. S. Novikova, T. A. Grigoreva, S. Vorona, A. V. Garabadzhiu, V. G. Tribulovich // Journal of computer-aided molecular design. – 2019. – Vol. 34, № 1. – P. 55–70.

Публикации в других изданиях

8. **Гуреев М.А.** Применение мультikonформационного докинга в современной методологии создания лекарственных препаратов / М.А. Гуреев, А.В. Гарабаджиу, В.Г. Трибулович // Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». – 2014. – с.134-137.
9. Григорьева Т.А., Структурная оптимизация производных замещённого изоиндолинона с противоопухолевой активностью. / Т.А. Григорьева, **М.А. Гуреев** // Фармация, Сборник материалов конференции «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ – ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО», – 2016: – с. 97-99.

Объекты интеллектуальной собственности

10. **Гуреев, М.А.,** Гарабаджиу А.В., Трибулович В.Г. Библиотека химических соединений научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная Фармакология» / Свидетельство о государственной регистрации БД, рег. №2013621492 от 02.12.2013. — М.: Роспатент, 2013.
11. **Гуреев, М.А.,** Гарабаджиу А.В., Трибулович В.Г. Библиотека Mdm2-N+ мишень-ориентированных оптимизирующих молекулярных фрагментов / Свидетельство о государственной регистрации БД, рег. №2017620223 от 21.02.2017. — М.: Роспатент, 2017.