

А. В. Козлов, В. О. Китап, З. Ю. Ткачук

## Молекулярная модель взаимодействия 2'-5' олигоаденилатов с протеинкиназой С

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины А. И. Корнелюком)

*Методом комп'ютерного моделювання побудована модель просторової структури протеїнкінази С (ПКС) у вільному стані. З метою вивчення можливості зв'язування з ПКС проведено *in silico* докінг ряду лігандів з білком з використанням програми AutoDock 3.0. Показано, що 2'-5' олигоаденилати зв'язуються в активному центрі та утворюють зв'язки з білком. Порівняльний аналіз зв'язування, у тому числі мономерів — аденозину, епоксиаденозину, виявив, що олигоаденилати можуть взаємодіяти з обома цими центрами.*

Ингибирование синтеза белков в вирусинфицированных клетках происходит при участии низкомолекулярных медиаторов 2'-5' олигоаденилатов (2-5 ОА) с общей формулой  $ppp2'-5' A_n$ , где  $n = 2 \div 10$  адениновых остатков, которые синтезируются с помощью интерферониндуцируемой двухспиральной РНК-зависимой 2'-5' олигоаденилатсинтетазы [1]. Биологическая активность таких олигонуклеотидов связана с активацией особого фермента — РНКазы L [2]. Предполагается, что активация фермента возможна только фосфорилированными 2-5 ОА [3], причем фосфатные группы обеспечивают связывание 2-5 ОА с ферментом. Тример 5'-трифосфат и тример 5'-дифосфат связываются и активируют РНКазу L. 5'-монофосфат связывается с ферментом, но не активирует РНКазу L. В то же время дефосфорилированные, “коровые” 2-5 ОА тримеры не связываются и не активируют РНКазу L.

Однако экспериментально было показано, что дефосфорилированные (“коровые”) 2-5 ОА ингибируют синтез ДНК и РНК и, таким образом, проявляют свойства фосфорилированных аналогов 2-5 ОА [4]. Механизм действия “коровых” 2-5 ОА до настоящего времени достоверно не изучен. Неизвестны и все возможные белки-мишени. Следует отметить, что кроме РНКазы L обнаружены и другие возможные мишени для действия 2-5 ОА. Так, в работе [5] показано, что 2-5 ОА влияют на активность топоизомеразы 1, причем ингибирующий эффект на активность топоизомеразы зависит от длины олигомера и от наличия фосфатных групп. Наиболее значительной ингибирующей активностью обладали фосфорилированные молекулы олигоаденилатов, которые содержали примерно 10 адениновых остатков. Показано также, что вирусная обратная транскриптаза ингибируется 2-5 ОА, что предполагает образование комплекса олигоаденилата с этим ферментом [6].

Ранее нами было показано, что “коровые” тримеры 2-5 ОА оказывают влияние на потенциалзависимые кальциевые каналы, активность которых связана с протеинкиназами [7]. Активность переносчиков кальция связана с их фосфорилированием, которое, в свою очередь, осуществляется протеинкиназами А и С. Ионы  $Ca^{2+}$  и DAG активируют протеинкиназу С (ПКС), поэтому синергизм в их действии реализуется уже, и прежде всего, на уровне этого фермента. Также показано, что ПКС фосфорилирует некоторые рецепторы, изменяя их сродство к лигандам и взаимодействие с G-белком [8].

Для понимания молекулярного механизма действия 2-5 ОА необходим анализ пространственной структуры их комплексов с мишенями, в том числе с белками, с которыми

они связываются в процессе функционирования. В этой связи с целью выяснения возможного влияния 2–5 ОА на активность ПКС нами проведено молекулярное моделирование взаимодействия 2–5 ОА и их модифицированных аналогов, а также их возможных продуктов гидролиза с ПКС. Предполагается, что ПКС может быть новой возможной молекулярной мишенью для связывания олигоаденилатов и, таким образом, влияние олигоаденилатов на кальциевые каналы может быть обусловлено прямым взаимодействием 2–5 ОА с ПКС.

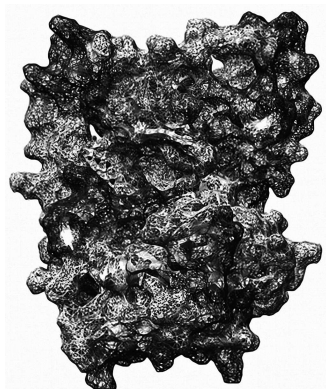
**Методы и материалы.** Модель пространственной структуры свободной ПКС построена с использованием таких пространственных структур в базе данных PDB: 2i0e. pdb — бета II — комплекс каталитического домена ПКС человека с ингибитором бисиндолимаимидом; 1zrz. pdb — кристаллическая структура атипичной ПКС — IOTA; 1xjd. pdb — кристаллическая структура тета-комплекса ПКС со стауропоорином; 2jdo. pdb — структура бета (AKT2) isoquinoline-5 sulfonic acid (2-(2-(4-chlorobenzyloxy)ethylamino)ethyl)amide. Модель пространственной структуры ПКС проверяли на устойчивость, используя метод моделирования молекулярной динамики с помощью программ NAMD [9] и VMD [10] для визуализации. Моделирование молекулярной динамики проводили в течение 10 пс в окружении растворителя — воды. Условия моделирования: 2776 молекул воды, температура 300 К, бокс представлял собой параллелепипед, в углах которого находилась вода. Полученную устойчивую пространственную структуру использовали для дальнейшего исследования активного центра ПКС при взаимодействии с лигандами. В качестве лигандов использовали следующие соединения: аденозин, эпоксиаденозин, 2–5 ОА димер; димер 2–5 ОА эпокси; тример 2–5 ОА; тример 2–5 ОА эпокси. С целью выявления потенциальных сайтов связывания лигандов с поверхностью ПКС проводили докинг по стандартной программе AutoDock 3.0. Анализ полученных моделей связывания лигандов с ПКС, а также образование вероятных связей лиганда с аминокислотами активного центра ПКС осуществляли с помощью программы Chimera. Поиск активного центра ПКС и определение конформации лиганда с наименьшей свободной энергией выполняли с помощью программы Argulab 4.01.

**Результаты и их обсуждение.** Построенную модель пространственной структуры свободной ПКС использовали для изучения взаимодействия с лигандами методом компьютерного докинга. Ранее нами было показано [11], что эпоксипроизводные “коровых” 2–5 ОА обладают значительной биологической активностью и повышенной устойчивостью к действию фосфодиэстераз [12]. При ферментативном гидролизе таких соединений образуются адениновые димеры и мономеры [12], которые также могут обладать биологической активностью. В связи с этим в качестве лигандов нами использованы модифицированные и нативные мономеры, димеры и тримеры.

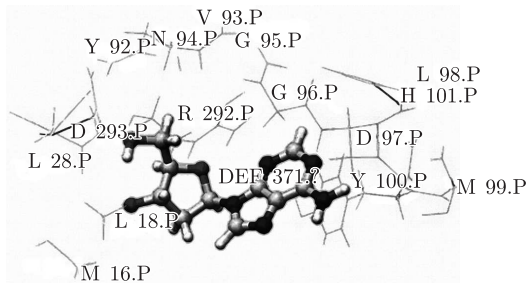
На рис. 1 приведены модели связывания указанных лигандов с ПКС и показаны аминокислотные остатки белка в радиусе 5 Å от лиганда, а также вероятные образующиеся связи лиганда с аминокислотами активного центра ПКС. Величина свободной энергии для комплекса аденозина с ПКС составила –7,04 ккал/моль, для комплекса эпоксиаденозина с ПКС — –6,88 ккал/моль. При сравнении связывания с поверхностью ПКС эпоксиаденозина и аденозина можно видеть, что эти два лиганда отличаются как энергией связывания, так и расположением на поверхности каталитического домена ПКС.

Величина свободной энергии связывания для 2–5 АрА (димер) составляет –6,76 ккал/моль, для димера 2–5 АрА-эпокси — –7,36 ккал/моль.

Методом моделирования изучено образование комплексов тримеров 2–5 АрАрА и 2–5 АрАрА-эпокси с ПКС. Следует отметить, что связывание тримеров олигоаденилатов с ПКС

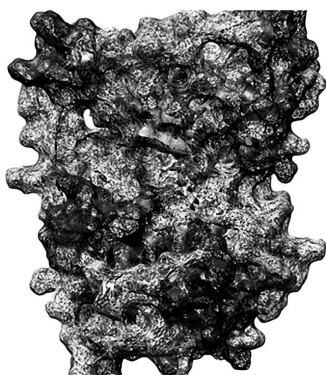


*a*

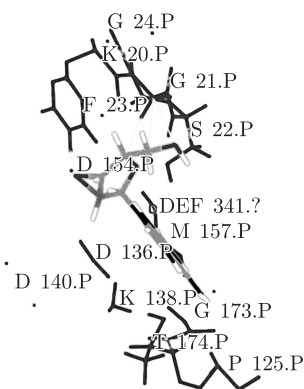


*б*

*A*

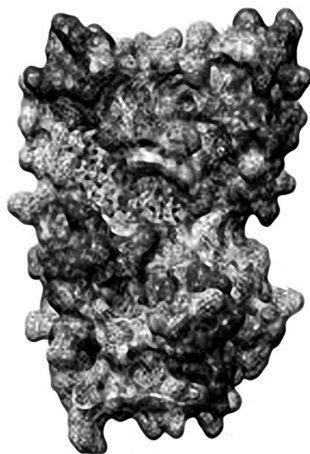


*a*

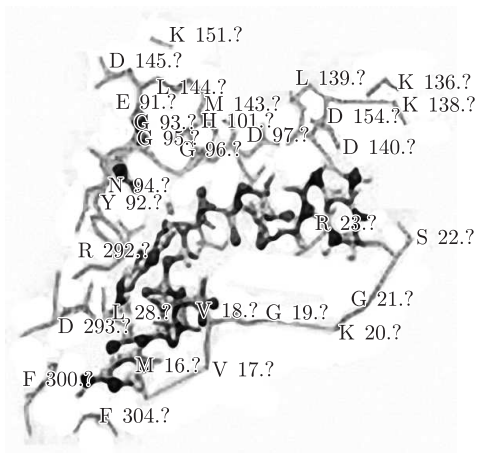


*б*

*B*



*a*



*б*

*B*

Рис. 1. Комплекс протеинкиназы С с лигандами: аденозином (*A*), эпоксиаденозином (*B*) и 2–5 АрАрА-эпокси (*B*), полученный путем докинга лиганда. *a* — связывание лиганда с поверхностью ПКС; *б* — аминокислотные остатки ПКС в радиусе 5 Å от лиганда, а также возможные связи лиганда с аминокислотами активного центра

отличается наиболее высокой специфичностью. Свободная энергия связывания лиганда 2–5 АрАрА с активным центром ПКС составила –6,99 ккал/моль. Согласно модели этот лиганд образует связи с 10 аминокислотными остатками активного центра ПКС.

Для комплекса лиганда 2–5 АрАрА-эпокси с активным центром ПКС (см. рис. 1, В) величина свободной энергии связывания составила –8,98 ккал/моль. Расположение лиганда в этом комплексе отличается в первую очередь тем, что экранируются молекулы воды и связи образуются с меньшим числом аминокислотных остатков активного центра ПКС, в сравнении с 2–5 АрАрА.

Таким образом, наибольшей свободной энергией связывания среди изученных лигандов характеризуется комплекс 2–5 АрАрА-эпокси олигоаденилата с ПКС.

Ранее нами экспериментально было показано, что дефосфорилированные (“коровые”) 2–5 ОА влияют на потенциалуправляемые кальциевые каналы [7]. Фосфорилирование кальциевых каналов осуществляется протеинкиназами, в том числе и ПКС. Результаты настоящей работы, полученные путем построения молекулярных комплексов, указывают на возможность прямого взаимодействия 2–5 ОА с активным центром ПКС. Установлено, что все исследованные лиганды связываются с ПКС в пределах каталитического центра на поверхности фермента (см. рис. 1). Наиболее эффективным связыванием отличается эпоксиформа 2–5 АрАрА, причем компактней всего в активном центре ПКС располагается именно этот лиганд (см. рис. 1, В). В то же время нами показана возможность образования более слабых комплексов аденозина и эпоксиаденозина с ПКС, что позволяет предположить участие продуктов ферментативного гидролиза тримера 2–5 АрАрА во влиянии на активность ПКС.

Связывание олигоаденилатов с ПКС зависит от вида модификации, при этом лучше всего связывается эпоксипроизводный тример. Связывание также зависит от количества мономеров аденина, причем тримеры являются наиболее предпочтительными.

Ранее было показано, что аденин, аденозин и некоторые его производные индуцируют активность ПКС [13], причем эффект наблюдается только для альфа-изомера, но не для бета-изомера. Активация аденозином ПКС индуцирует переносчики переноса хлора через клеточные мембраны [14], активность которых связана с фосфорилированием. С другой стороны, наличие ПКС необходимо для работы 2–5 синтазы [15].

Таким образом, методом компьютерного моделирования построена оптимизированная модель пространственной структуры ПКС в свободном состоянии. Для изучения возможности связывания 2–5 ОА олигоаденилатов с ПКС проведен *in silico* докинг ряда лигандов с белком. Полученные результаты предполагают возможное прямое взаимодействие различных аденинсодержащих соединений, в том числе олигоаденилатов, со связывающими центрами на поверхности ПКС. Сравнительный анализ связывания олигоаденилатов и аденозина в активном центре ПКС показал, что олигоаденилаты перекрывают аденозинсвязывающий центр в ферменте, а также второй сайт, специфичный для эпоксипроизводных. Предполагается, что взаимодействие олигоаденилатов по этим двум сайтам может приводить к стимуляции взаимодействия ПКС с IP<sub>3</sub>-рецепторами и последующим высвобождением ионов Ca<sup>2+</sup>.

1. Castelli J. C., Hazzei B., Wood K. et al. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2–5A system // J. Exp. Med. – 1997. – **186**, No 2. – P. 967–972.
2. Carroll S. S., Chen E., Viscount T. et al. Cleavage of oligoribonucleotides by the 2',5'-oligo-adenylate-dependent ribonuclease L // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, No 3. – P. 4988–4992.
3. Castelli J. C., Hassel B. A., Maran A. et al. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis // Cell Death Differ. – 1998. – **5**, No 1. – P. 313–320.

4. *Toninaga A., Saito S., Kohno S.* Antiviral effects of 2,5 oligoadenylates (2-5As), and related compounds // *Microbiology and Immunology*. – 1990. – **34**, No 9. – P. 737–747.
5. *Schroder H. C., Kelve M., Schacke H. et al.* Inhibition DNA topoisomerase I activity by 2-5 oligoadenylates and mismatched double-stranded RNA in uninfected and HIV – 1-infected H9 cells // *Chem. – Biol. Interact.* – 1994. – **90**, No 2. – P. 169–183.
6. *Liu D. K., Owens G. F.* Inhibition of viral reverse transcriptase by 2-5 oligoadenylates // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* – 1987. – **145**, No 1. – P. 291–297.
7. *Kostuyk P. G., Kozlov A. V., Tkachuk Z. Yu. et al.* Effect of “core” 2',5'-oligoadenylates on the phosphorylation-dependent calcium channels in GH3 cells // *Укр. биохим. журн.* – 1995. – **67**, No 1. – P. 26–32.
8. *Swartz K. J.* Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: Disruption of G protein-mediated inhibition // *Neuron*. – 1993. – **11**, No 2. – P. 305–320.
9. *Phillips J. C., Braun R., Wei Wang et al.* Scalable molecular dynamics with NAMD // *J. Comput. Chem.* – 2005. – **26**, No 4. – P. 1781–1802.
10. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* VMD – Visual Molecular Dynamics // *J. Mol. Graphics*. – 1996. – **14**, No 1. – P. 33–38.
11. *Сидорик Л. Л., Дубей И. Я., Бобык В. И., Козлов А. В. и др.* Терапевтические эффекты действия различных доз 2'-5'-олигоаденилата при экспериментальном миоиндуцированном повреждении миокарда // *Доп. НАН України*. – 2001. – № 9. – С. 161–165.
12. *Козлов А. В., Ткачук З. Ю.* Изучение устойчивости различных аналогов 2,5-олигоаденилатов к действию фосфодиэстераз // *Биополимеры и клетка*. – 1994. – **10**, № 1. – С. 47–53.
13. *Balazovich K. J., Boxer L. A.* Extracellular adenosine nucleotides stimulate protein kinase C activity and human neutrophil activation // *J. Immunol.* – 1990. – **15**, No 2. – P. 631–637.
14. *Fang Yu., Floyd-Smith G.* Protein Kinase C Is Required for Induction of 2',5'-Oligoadenylate Synthetases // *Exp. Cell Res.* – 1997. – **234**, No 2. – P. 240–248.
15. *Schwiebert E. M., Karlson K. H., Friedman P. A. et al.* Adenosine regulates a chloride channel via protein kinase C and G protein in a rabbit cortical collecting duct cell line // *J. Clin. Invest.* – 1992. – **89**, No 3. – P. 834–841.

*Институт молекулярной биологии  
и генетики НАН Украины, Киев*

*Поступило в редакцию 05.08.2008*

**A. V. Kozlov, V. O. Kitam, Z. Yu. Tkachuk**

### **Molecular model of the interaction of 2'-5' oligoadenylates with protein kinase C**

*A model of the spatial structure of protein kinase C is built by the computational modeling method. With the aim to explore the possibility of the interaction of 2'-5' oligoadenylates with protein kinase C in silico, a molecular docking of several ligands with protein kinase has been performed using the AutoDock 3.0 program. It is shown that 2'-5' oligoadenylates bind to the active center of protein kinase C and interact with some groups of the protein. The comparative analysis of the binding of oligoadenylates with monomers of adenosine and epoxyadenosine has revealed that oligoadenylates can overlap both binding centers.*