



УДК 577.3

© 2009

**П. О. Бориско, О. О. Судаков, Ю. І. Прилуцький**

### **Застосування методів молекулярного моделювання для пошуку штучних інгібіторів АТФазної активності міозину**

*(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)*

*З використанням методів молекулярного моделювання знайдено сполуки, які мають високий рівень передбачуваної спорідненості до міозину і можуть бути конкурентними інгібіторами його АТФазної активності.*

Значну кількість захворювань опорно-рухової системи, таких як судоми, міозити тощо, можна вилікувати, знизивши скоротливу активність міозину. Основним етапом реалізації м'язового скорочення на молекулярному рівні є зв'язування і подальший гідроліз молекули АТФ міозином.

З літературних джерел відомо, що процес м'язового скорочення пов'язаний з утворенням актоміозинового комплексу та наступними конформаційними змінами цього комплексу за рахунок енергії, яка вивільняється при ферментативному розщепленні АТФ міозином, тобто АТФазна активність актоміозину або міозину є такою характеристикою, за якою можна судити про скоротливу активність м'язів [1]. Існує багато доказів того, що АТФазна активність пов'язана з процесом м'язового скорочення. В інтактних м'язах ізометричне напруження прямо пропорційне  $Mg^{2+}$ -АТФазній активності [2].

За сучасними уявленнями, конформаційні зміни, що відбуваються в молекулі міозину, мають безпосереднє відношення до функціонування міозину як ферменту, що гідролізує АТФ. На сьогодні актуальними є питання про конформаційні зміни безпосередньо в активному центрі міозину, а також про взаємне розташування ділянок зв'язування субстрату та металоакцепторних центрів [3]. Для дослідження структурних характеристик активного центру міозину використовували спін-мічений аналог АТФ та хімічний аналог  $Mg^{2+}$  — парамагнітний іон  $Mn^{2+}$ . Встановлено, що при зв'язуванні в активному центрі іонів марганцю реалізується потрібний комплекс: "міозин — двовалентний катіон — АТФ". Виявлено існування двох типів центрів сильного зв'язування  $Mn^{2+}$  і те, що одна з металоакцепторних ділянок розміщена в активному центрі та функціонує ефективно лише за наявності в реальній структурі АТФ.

Наша мета — застосовуючи методи молекулярного моделювання, знайти речовини, які з найбільшою вірогідністю інгібуватимуть АТФазну активність міозину, зменшуючи, таким чином, силу скорочення м'яза.

**Методика розрахунків.** Для передбачення фармако-кінетичних властивостей досліджуваних речовин була використана модифікована програма QikProp з пакета Schrodinger [4, 5]. Усі процедури докінгу проводили за допомогою програмного пакета QXP/Flo+ [6]. Для докінгу вибрана 3-D структура S1 фрагмента міозину (PDB код 1KWO, роздільна здатність відбитка рентгена 3,8 Å). Для створення моделі сайту зв'язування білка мішені використовували вбудовані інструменти програмного пакета QXP/Flo+.

Відбір оптимальних результатів проводили як за геометричними показниками положення ліганду в центрі зв'язування комплексу “білок — ліганд”, так і за енергетичними показниками, використовуючи вбудовані в програмі QXP функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі “білок — ліганд”.

**Результати та їхнє обговорення.** АТФазний центр (нуклеотидзв'язуюча кишеня) формується 25 та 50 кДа-доменами [7]. Активна кишеня у відкритій конформації, коли відсутній субстрат, досягає глибини 1,3 нм, довжини 1,5 нм на поверхні голівки та 1,3 нм на дні кишені. Основу нуклеотидзв'язуючого центру формує  $\alpha$ -спіраль з амінокислотних залишків Lys 18- Ile 199. Важливою складовою АТФ-зв'язуючого центру є досить консервативна ділянка, яка містить дві дисульфідні групи Cys 707 (705) та Cys 697 (695). Ці високореактивні групи не входять безпосередньо до складу активного центру, а знаходяться в складі двох  $\alpha$ -спіралей His 688- Asp 698 та Val 700- Arg 708, які проходять під АТФ-зв'язуючим центром. Важливість цих груп полягає в тому, що в присутності АТФ вони можуть формувати дисульфідний зв'язок, який служить пасткою для субстрату в активному центрі міозинової АТФази. Ковалентна зшивка між ними також призводить до міцного утримання в активному центрі продуктів АТФазної реакції, тобто до інгібування АТФази.

Для відбору потенційних інгібіторів АТФазної активності міозину використано базу з 400000 комерційно доступних органічних сполук. З метою виявлення лікоподібних речовин [8] серед доступних проводили попереднє фільтрування. Для передбачення фармакокінетичних властивостей використовували програму QikProp з пакета Schrodinger [4, 5], у результаті чого база речовин — потенційних інгібіторів — була зменшена і становила 122435 структур. До подальшого дослідження долучали лише ті речовини, що відповідали таким критеріям:

- молекулярна маса  $\leq 500$ ;
- коефіцієнт розподілу на межі фаз октанол \ вода (LogP) [9]  $\leq 5$ ;
- кількість донорів водню  $\leq 5$ ;
- кількість акцепторів водню  $\leq 10$ ;
- обертальні зв'язки  $\leq 10$ ;
- доступна для полярного розчинника площа поверхні молекули  $170 \text{ \AA}^2$ .

Враховуючи структурно-функціональну подібність АТФ-зв'язуючого сайту міозину та кіназ, для подальшого фільтрування потенційних інгібіторів використовували кіназні структурні фільтри, що дозволило зменшити кількість речовин до 70000 сполук [10].

Використання вбудованих інструментів програмного пакета QXP/Flo+ для створення моделі сайту зв'язування білка мішені — S1 фрагмента міозину (PDB код 1KWO, роздільна здатність рентгенівського відбитка 3,8 Å), дало змогу, зокрема, видалити молекули води та долучити до розрахунків тільки амінокислоти в радіусі 5 Å від ліганду та наступний за ними шар. Вибрані амінокислоти відіграють головну роль у зв'язуванні з природним лігандом

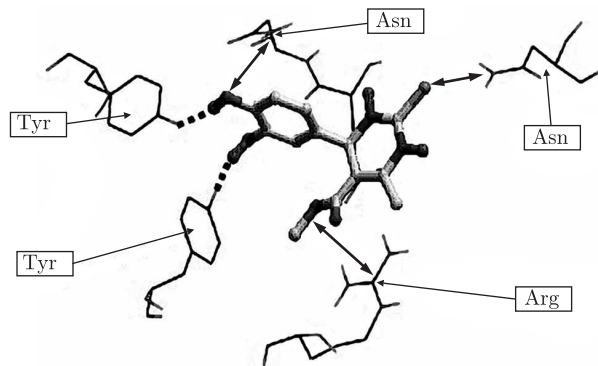


Рис. 1. Модель взаємодії метилового естеру 4-(3,4-дигідрокси-феніл)-6-метил-2-тіоксо-1,2-дигідро-піримідин-5-карболової кислоти з амінокислотами каталітичного сайту S1 фрагмента міозину. Пунктиром показано ключові водневі зв'язки, подвійними стрілками — електростатичну взаємодію

та екранують решту білка на рівні, достатньому для того, щоб враховувати тільки їх. З урахуванням даних літератури [11] було проведено протонування необхідних амінокислот моделі сайту зв'язування білка. Усі гідроксильні групи бічних радикалів — Tyr 132, Tyr 126, Tyr 113, Thr 183, Glu 184, було депротоновано, а NH<sub>2</sub>, відповідно, протоновано — Lys 677, Lys 188, Lys 182.

Застосований нами докінг з рухомим лігандом та нерухомим сайтом білка за алгоритмом систематичного докінгу SDOCK+ [12] засвідчив значний рівень кореляції енергетичних параметрів із середнім квадратичним відхиленням рентгенівських даних у разі відповідного набору тренінгових сполук. Максимальна кількість кроків при пошуку потенційних інгібіторів АТФазної активності міозину становила 300. Подальше фільтрування проводили за геометричними показниками положення ліганду в центрі зв'язування комплексу “білок — ліганд” та за енергетичними показниками, використовуючи вбудовані в програмі QXP функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі “білок — ліганд” (рис. 1).

Кінцеве фільтрування проводили за допомогою програмного пакета `multy_rmsd`, розробленого О. О. Судаковим у лабораторії паралельних обчислень радіофізичного факультету КНУ ім. Тараса Шевченка.

Ми використали фільтри за найближчим атомом, водневими зв'язками та “Out coefficient” фільтр.

Фільтр за найближчим атомом дозволяє знайти ті ліганди, які геометрично знаходяться найближче до білка.

Для виявлення водневих зв'язків між білком та досліджуваним лігандом спиралися на класичні геометричні ознаки Н-зв'язування — відстань між атомами А і В та кут Н-зв'язування АНВ для Н-зв'язку АН...В. Будь-який водневий зв'язок визначається коефіцієнтом сили зв'язку, що може бути розрахований за формулою

$$p_H = A e^{-\frac{r_{A1}-r_H}{R_H}} e^{-\frac{r_{A2}-r_H}{R_H}} e^{-\cos \phi},$$

де  $r_{A1}$  та  $r_{A2}$  — координати першого та другого акцепторів водню відповідно;  $r_H$  — координати атома водню;  $R_H$  — максимальна довжина водневого зв'язку;  $\phi$  — кут між зв'язками “акцептор 1” — “атом водню” та “атом водню” — “акцептор 2”.

“Out coefficient” фільтр вилучає сполуки, в яких значна частина ліганду знаходиться поза геометричними межами сайту зв'язування, що збільшує імовірність руйнування комп-

лексу “ліганд — білок”. “Out coefficient” визначається як співвідношення кількості атомів ліганду, доступних для зв’язування із сторонніми молекулами (напр., розчинник), до загальної кількості атомів ліганду.

Розглянемо результати проведеного докінгу на прикладі метилового естеру 4-(3,4-дигідрокси-феніл)-6-метил-2-тіоксо-1,2-дигідро-піримідин-5-карболової кислоти (4-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2-dihydro-pyrimidine-5-carboxylic acid methyl ester).

Досліджувана речовина формує чотири водневі зв’язки в активному центрі білка. Довжина водневого зв’язку між гідроксильною групою в пароположенні та Тут 113 становить 1,92 Å, а між гідроксилем у метаположенні та Тут 132 — 1,53 Å. Карбонільна група утворює два водневі зв’язки: з аміногрупами Тут 126 та Arg 127 з кутом між ними 49,85°. Довжина цих зв’язків становить 2,19 та 2,31 Å відповідно. Спостерігається електростатична взаємодія між залишком Arg 128 та складноєфірною групою, що знаходяться на відстані 3,87 Å одне від одного.

Між сіркою та амідною групою Asn 237 на відстані 3,12 Å відбувається електростатична взаємодія. Також цей тип взаємодії спостерігається між гідроксилем в пароположенні та амідною групою Asn 185, що знаходяться на відстані 4,24 Å одне від одного.

На нашу думку, відібрані речовини доцільно дослідити щодо їхнього впливу на реакцію гідролізу АТФ міозином, паралельно з їхнім тестуванням на ряді споріднених ферментів (інших АТФаз, кіназ тощо). При цьому передбачається підтвердити високу специфічність вибраних інгібіторів та вилучити ті, що матимуть токсичний вплив при застосуванні речовин як фармакологічних препаратів.

Таким чином, у результаті проведеного молекулярного моделювання отримано 82 сполуки, які мають високий рівень передбачуваної спорідненості до міозину і, на нашу думку, можуть бути конкурентними інгібіторами його АТФазної активності. Подальші дослідження мають включати синтез та тестування *in vitro* аналогів найактивніших сполук з метою їхньої подальшої оптимізації.

*Автори щиро вдячні канд. біол. наук М. О. Платонову (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України) за допомогу в проведенні розрахунків, обговорення результатів та консультацій.*

1. Jeneson J. A., Westerhoff H. T., Kushmerick M. J. A metabolic control analysis of kinetic controls in ATP free energy metabolism in contracting skeletal muscle // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. – 2000. – **279**, No 3. – P. C813-C832.
2. Westerblad H., Lännergren J., Allen D. G. Slowed Relaxation in Fatigued Skeletal Muscle Fibers of Xenopus and Mouse Contribution of  $[Ca^{2+}]_i$  and Cross-bridges // J. Gen. Physiol. – 1997. – **109**, No 3. – P. 385–399.
3. Bertazzon A., Tsong T. Y. Study of effects of pH on the stability of domains in myosin rod by high-resolution differential scanning calorimetry // Biochemistry. – 1990. – **10**, No 29. – P. 6453–6459.
4. Duffy E. M., Jorgensen W. L. Prediction of Properties from Simulations: Free Energies of Solvation in Hexadecane, Octanol, and Water // J. Amer. Chem. Soc. – 2000. – **122**. – P. 2878–2888.
5. Jorgensen W. L., Duffy E. M. Prediction of Drug Solubility from Monte Carlo Simulations // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2000. – **10**. – P. 1155–1158.
6. McMartin C., Bohacek R. S. QXP: powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design // J. Comput. Aided Mol. Des. – 1997. – **11**, No 4. – P. 333.
7. Ingraham R. H., Swenson C. A. Stability of the  $Ca^{2+}$ -specific and  $Ca^{2+}$  –  $Mg^{2+}$  domains of troponin C. Effect of pH // Eur. J. Biochem. – 1983. – **132**, No 1. – P. 85–88.
8. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney C. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // Adv. Drug Delivery Rev. – 1997. – **23**. – P. 3–25.
9. Cronin D., Mark T. The Role of Hydrophobicity in Toxicity Prediction // Current Computer – Aided Drug Design. – 2006. – **2**, No 4. – P. 405–413.

10. *Dubinina G. G., Chupryna O. O., Platonov M. O. et al.* In silico design of protein kinase inhibitors: successes and failures // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. – 2007. – **7**, No 2. – P. 171–188.
11. *Houdusse A., Cohen C.* Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2 angstrom resolution // *Structure*. – 1996. – **4**. – P. 21–32.
12. *Lorber D. M., Shoichet B. K.* Flexible ligand docking using conformational ensembles // *Protein Science*. – 1998. – **17**, No 4. – P. 938–950.

*Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка*

*Надійшло до редакції 01.09.2008*

**P. O. Borysko, O. O. Sudakov, Yu. I. Prylutsky**

### **Search for inhibitors of myosin ATP-ase activity using molecular modeling**

*Compounds, having a high level of the predicted affinity to the myosin ATP-binding site, are found using molecular modeling methods. The compounds may be potent inhibitors of ATP-ase activity of myosin.*