

УДК 577.152.161, 577.151.02

# Идентификация новых структурных фрагментов для дизайна ингибиторов лактатдегидрогеназы А

Д. К. Нилов<sup>1\*</sup>, А. В. Куликов<sup>2</sup>, Е. А. Прохорова<sup>3</sup>, В. К. Швядас<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

\*E-mail: nilov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 20.01.2016

Принята к печати 05.04.2016

**РЕФЕРАТ** Лактатдегидрогеназа А играет важную роль в метаболизме глюкозы в опухолевых клетках человека и представляет собой перспективную мишень для химиотерапии. С использованием компьютерного скрининга сульфонов и экспериментальной проверки ингибиторных свойств выявлены молекулярные фрагменты, способные связываться в активном центре данного фермента и реализовать водородные связи заряженной сульфогруппы с гуанидиновой группой Arg168, а также дополнительные взаимодействия с петлей 96–111 в закрытой конформации. Показано, что сульфогруппа занимает положение, соответствующее карбоксильной группе субстрата и его структурных аналогов, а присоединенная посредством линкера бензотиазольная группа располагается на участке связывания кофермента NADH. Показана важность объединения отдельных структурных элементов ингибитора с помощью линкера, установлены пути дальнейшей модификации структуры для создания более эффективных ингибиторов лактатдегидрогеназы А.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** докинг, ингибитор, лактатдегидрогеназа, молекулярное моделирование, сульфогруппа, сульфонаты.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛДГ-А – изоформа А лактатдегидрогеназы.

## ВВЕДЕНИЕ

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует превращение продукта гликолиза пирувата в лактат, сопровождающееся окислением NADH до NAD<sup>+</sup> (рис. 1). В здоровом организме человека изоформа А ЛДГ (ЛДГ-А) находится преимущественно в скелетных мышцах, изоформа В – в сердечной мышце, С – в яичках [1, 2]. Во многих опухолевых клетках наблюдается изменение метаболизма, называемое эффектом Варбурга: активация превращения пирувата с помощью ЛДГ и снижение окисления пирувата в митохондриях [3, 4]. Одна из причин усиления гликолитической активности – увеличенная экспрессия ЛДГ-А [5, 6]. Этот фермент считается перспективной мишенью в терапии опухолей, так как играет важную роль в обеспечении жизни и пролиферации опухолевых клеток [7–9]. В этой связи представляет интерес поиск селективных ингибиторов ЛДГ-А человека и изучение их влияния на клеточном уровне.

Известно несколько классов ингибиторов [10, 11], большинство из которых содержат в своей структуре карбоксильную группу. В качестве примера можно привести структурный аналог субстрата оксамат и его многочисленные производные [12, 13]. Ключевыми для связывания пирувата и оксамата являются водородные связи карбоксильной группы с консервативным остатком Arg168 [14, 15]. Также в связывании субстрата, кофермента и ингибиторов участвуют остатки подвижной петли 96–111 [16], среди которых можно отметить Arg105 (стабилизирует переходное состояние в ходе превращения субстрата). Установлены кристаллические структуры комплексов ЛДГ-А человека, в которых петля 96–111 представлена в закрытой или открытой конформации в зависимости от строения ингибитора [17–19]. В последнее время при разработке ингибиторов ЛДГ-А предприняты попытки поиска соединений, способных взаимодействовать с участками связыва-

ния субстрата и кофермента [20, 21]. Перспективным путем решения этой задачи представляется поиск молекулярных фрагментов – небольших молекул, способных образовать специфические взаимодействия с выбранными участками белка. В дальнейшем такие фрагменты, соединенные посредством подходящего линкера, могут стать основой новых, более эффективных ингибиторов фермента. Анализ опубликованных данных о связывании субстрата, а также производных оксаминовой и малоновой кислоты указывает на важность электростатических взаимодействий с гуанидиновой группой Arg168 в активном центре ЛДГ-А. С учетом этого фактора была поставлена цель – изучить возможность использования отрицательно заряженной сульфогруппы при дизайне структуры новых ингибиторов.

Сульфозамещенные производные нафталина **2** и **3** (рис. 1) упоминались в работе, посвященной поиску ингибиторов ЛДГ из малярийного паразита *Plasmodium falciparum*, однако они проявили лишь слабую ингибиторную активность [22]. Кристаллографическая структура комплекса **2** с ЛДГ из *P. falciparum* (PDB ID 1u4s) показала, что сульфогруппа ингибитора взаимодействует с Arg171 (соответствует Arg168 в ЛДГ-А человека). Предположили, что ингибитор **2** связывается схожим образом с апоформой и комплексом ЛДГ–кофермент, не конкурируя с NADH. Необходимо отметить важные различия в устройстве активного центра ЛДГ паразита и человека, главным образом, связанные с расположением кофермента и подвижной петли активного центра, которая в ЛДГ человека короче на пять остатков [23]. Это позволяет предположить, что структурные фрагменты ингибиторов ЛДГ-А человека на основе сульфонатов должны отличаться от соединений **2** и **3**. В ранее проведенном исследовании мы создали модели ЛДГ-А человека для поиска ингибиторов, конкурентных по отношению к субстрату и к коферменту, а также определили структурные критерии отбора потенциальных ингибиторов [24]. Разработанная методика использована для скрининга молекулярных фрагментов с сульфогруппой, которые могли бы стать аддитивными компонентами дизайна более эффективных ингибиторов ЛДГ-А.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Компьютерный скрининг ингибиторов ЛДГ-А проводили среди низкомолекулярных соединений из библиотеки Vitas-M [25]. С помощью программы ACD/Spectrus DB 14.0 [26] отобрали соединения, содержащие сульфогруппу и удовлетворяющие правилу трех [27, 28]. Это правило определяет диапазон физико-химических параметров, которым характеризуются молекулярные фрагменты (молекулярная

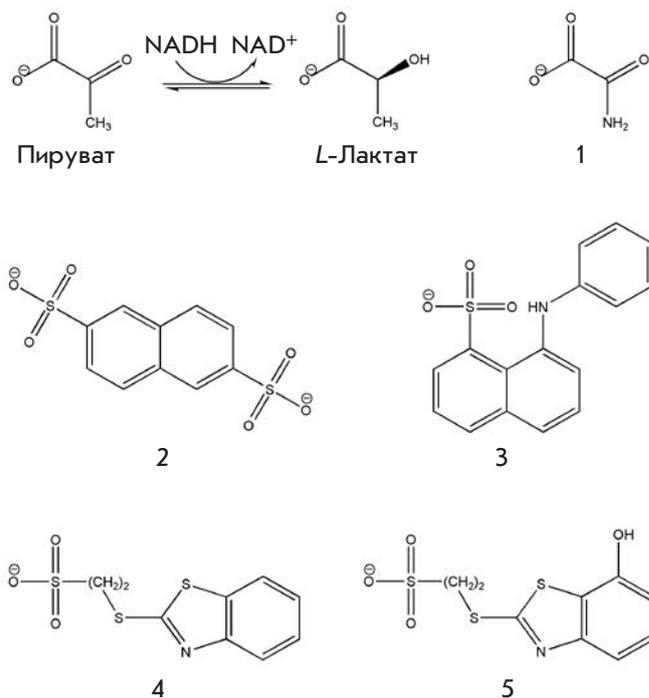


Рис. 1. Химические структуры субстратов и ингибиторов (**1–5**) ЛДГ-А человека. **1** – оксамат, **2** – нафталин-2,6-дисульфонат, **3** – 8-(фениламино)нафталин-1-сульфонат, **4** – 2-(бензотиазол-2-илсульфанил)-этансульфонат, **5** – 2-(7-гидроксибензотиазол-2-илсульфанил)-этансульфонат

масса < 300, log P ≤ 3, доноры водородной связи ≤ 3, акцепторы водородной связи ≤ 3, вращаемые связи ≤ 3). Молекулярный докинг соединений из созданной сфокусированной библиотеки проводили с использованием программы Lead Finder 1.1.15 [29, 30] в режиме «extra precision» и моделей ЛДГ-А человека (со связанной молекулой NADH и без нее), полученных в нашей предыдущей работе [24]. На первом этапе отбор ингибиторов осуществляли путем отбраковки соединений, при связывании которых с ЛДГ-А расстояние между серой сульфогруппы и углеродом гуанидиновой группы Arg168 составляло более 5.5 Å. В дальнейшем проверяли способность соединений, соответствующих критериям проведенной структурной фильтрации, образовывать водородные связи и гидрофобные контакты с остатками петли 96–111 [24]. Визуализацию и анализ структур осуществляли с помощью VMD 1.9.2 [31].

Ферментативную активность ЛДГ определяли с использованием препарата из мышц кролика (Sigma-Aldrich). Для приготовления растворов и проведения измерений использовали 0.1 М калий-

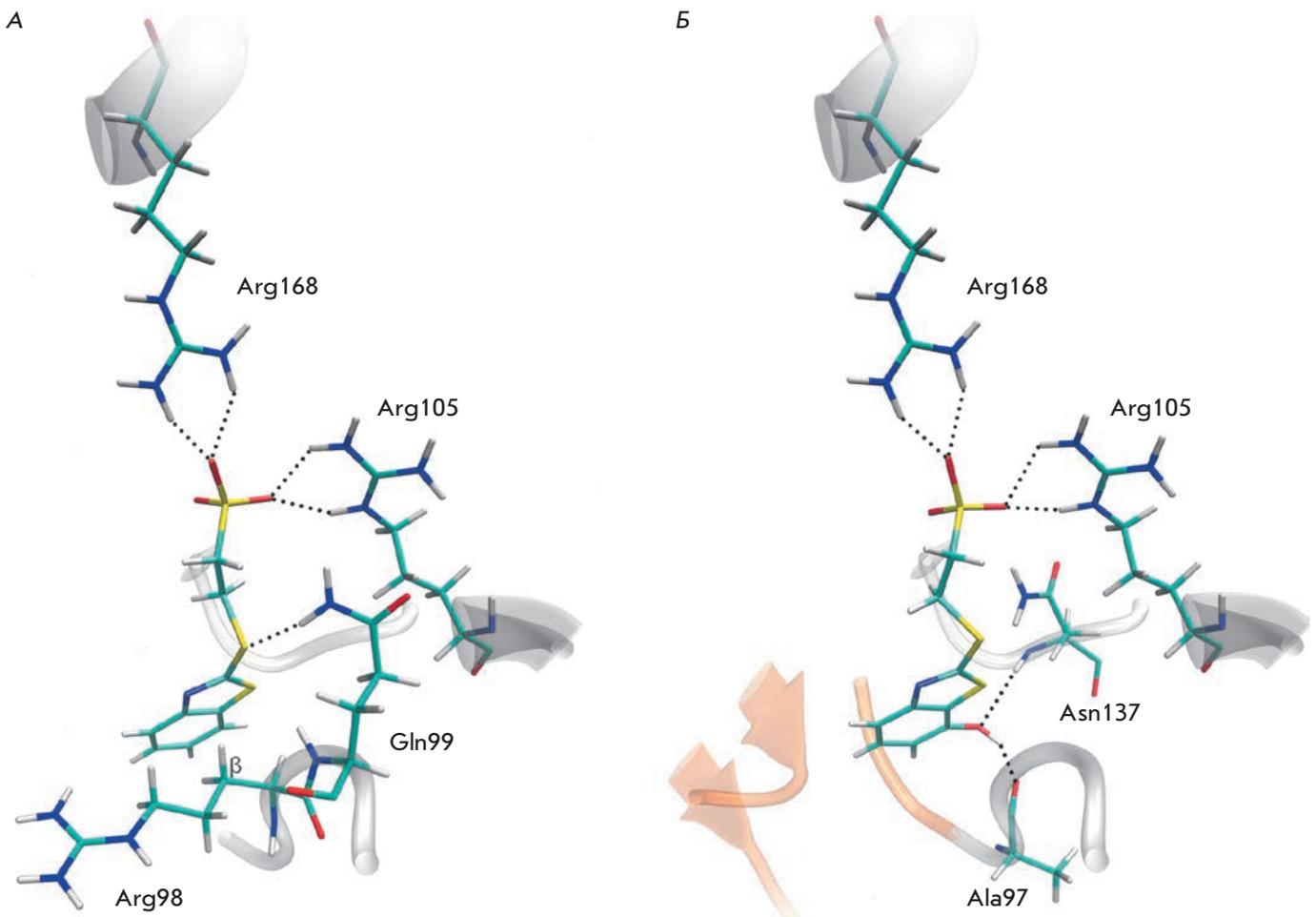


Рис. 2. Положения ингибиторов в активном центре ЛДГ-А человека, найденные в результате молекулярного моделирования. А – связывание соединения 4: показаны водородные связи сульфогруппы с Arg168, а также взаимодействия с остатками петли активного центра Arg98, Gln99 и Arg105. Б – связывание соединения 5: показаны дополнительные водородные связи гидроксильного заместителя с Ala97 и Asn137, не показано взаимодействие с Arg98 и Gln99. Оранжевым цветом отмечена область связывания адениновой части кофермента

фосфатный буфер, pH 7.0. Раствор фермента, содержащий 1% (г/мл) бычьего сывороточного альбумина (БСА), готовили непосредственно перед измерениями. Активность ЛДГ-А измеряли спектрофотометрически при 340 нм по уменьшению поглощения NADH в реакции превращения пирувата в лактат. Измерения проводили с использованием спектрофотометра Shimadzu UV-1800. В кювету помещали реакционную смесь, содержащую буфер, пируват (400 мкМ), NADH (20 мкМ) и ингибитор, термостатировали в течение 5 мин при 37°C, после чего начинали реакцию добавлением аликвоты фермента. Начальную скорость ферментативной реакции определяли в двух независимых опытах. Значения IC<sub>50</sub> (концентрация ингибитора, при которой активность

фермента снижена на 50%) определяли при варьировании концентрации ингибитора в диапазоне от 0 до 8 мМ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кристаллографические исследования показали, что сульфозамещенное производное 2 способно связываться только с открытой конформацией ЛДГ из *P. falciparum* с неупорядоченной петлей активного центра. Очевидно, что структурные фрагменты, содержащие сульфогруппу и способные связываться с ферментом в закрытой конформации, т.е. в тех условиях, когда можно ожидать эффективного взаимодействия с петлей 96–111, должны весьма сильно отличаться от соединений 2 и 3. Для выявления но-

вых фрагментов из библиотеки низкомолекулярных соединений были отобраны сульфоновые кислоты и их соли (71 соединение). Соединения докировали в активный центр разработанных ранее моделей ЛДГ-А человека, после чего анализировали их способность осуществлять важное электростатическое взаимодействие с остатком Arg168, а также дополнительные взаимодействия с остатками петли 96–111 в закрытой конформации. В результате проведенного скрининга выбран наиболее перспективный ингибитор – соединение **4**, способное эффективно связываться с апоформой ЛДГ-А ( $\Delta G^{\text{calc}} = -9.9$  ккал/моль).

Экспериментально изучали ингибиторные свойства соединения **4** в отношении к ЛДГ из мышц кролика, активный центр которой обладает высоким структурным сходством с ЛДГ-А человека [32], определенное значение  $IC_{50}$  составило 1.2 мМ. Интересно, что ингибитор **4** связывается схожим образом с исследованным ранее производным оксамата STK381370 ( $\Delta G^{\text{calc}} = -7.9$  ккал/моль,  $IC_{50}$  5 мМ) [24], образуя дополнительные контакты с петлей 96–111, однако эффективность его взаимодействия выше. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используемая модель закрытой конформации фермента адекватно симулирует связывание соединений разных классов.

Локализация структурного фрагмента с заряженной сульфогруппой на участке связывания субстрата приводит к стабилизации положения ингибитора за счет образования водородных связей с гуанидиновыми группами Arg168 и Arg105 (рис. 2А). Чрезвычайно большое значение для дизайна ингибиторов ЛДГ-А имеет способ соединения отдельных элементов структуры. Так, например, благодаря гибкости линкера, связывающего сульфогруппу и бензотиазольную группу, возможна реализация одновременных взаимодействий соединения **4** как с участком связывания субстрата, так и никотинамидного нуклеотида NADH. Тиоэфирный линкер образует водородную связь с боковой цепью Gln99, а бензотиазольная группа, расположенная на участке первого остатка рибозы кофермента, образует выгодный гидрофобный контакт с  $C^{\beta}$ -атомом боковой цепи Arg98. Необходимо отметить, что перечисленные взаимодействия с остатками Arg98, Gln99 и Arg105 реализуются только при переходе петли активного центра в закрытую конформацию и важны для ее стабилизации. Также при связывании сульфоната имеют место дополнительные взаимодействия: характерные для оксамата водородные связи между сульфогруппой, Asn137 и Thr247, гидрофобные контакты линкера с Ile241 и бензотиазольной группы с Val30, водородная связь гетероатома кольца с карбоксамидом Asn137 (на рисунке не показаны).

Среди изученных в ходе скрининга сульфопроизводных представлены структуры без гибкого линкера (в том числе, производные нафталина), с линкером, удлинённым на одно метиленовое звено, а также с бензолом, пирролом и пиридином на участке бензотиазола **4**. Все эти соединения характеризовались худшей энергией связывания и не обладали способностью вступать во взаимодействия, достаточные для стабилизации петли 96–111 в закрытой конформации. Это указывает на то, что структура остова **4** является наиболее оптимальной для связывания в активном центре и может служить основой для дальнейших модификаций. Так, например, введение гидроксильной группы в положение 7 позволяет этому заместителю занять место 3'-ОН-группы первого остатка рибозы NADH и образовать соответствующие водородные связи с остовами Ala97 и Asn137 (соединение **5**, рис. 2Б). Расчет энергии связывания ( $\Delta G^{\text{calc}} = -10.9$  ккал/моль) показывает, что данная модификация приводит к дополнительному энергетическому выигрышу. Увеличение эффективности ингибирования фермента при введении заместителей в бензотиазольную группу говорит о перспективности дальнейшего поиска структурных фрагментов и путей их объединения с целью получения аддитивного (а, может быть, и синергического) эффекта при создании новых ингибиторов ЛДГ-А.

## ВЫВОДЫ

Целью настоящей работы был поиск новых молекулярных фрагментов для дизайна ингибиторов ЛДГ-А, способных реализовать характерное для субстратов и ранее описанных ингибиторов взаимодействие заряженной кислотной группы с Arg168 и аминокислотными остатками петли активного центра на участке связывания субстрата, а также взаимодействие с участком связывания кофермента. В результате компьютерного скрининга и экспериментальной проверки ингибиторных свойств обнаружены новые фрагменты, включающие сульфогруппу, линкер и бензотиазольную группу. Проведенные исследования позволили выявить наиболее значимые взаимодействия и аминокислотные остатки, которые принимают участие в стабилизации положения ингибиторов с сульфогруппой (Ala97, Arg98, Gln99, Arg105, Arg168) в закрытой конформации фермента. Таким образом, апробирована методология поиска новых ингибиторов ЛДГ-А, и установлены пути дальнейшей оптимизации их структуры. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-08-01251).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kolappan S., Shen D.L., Mosi R., Sun J., McEachern E.J., Vocado D.J., Craig L. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2015. V. 71. P. 185–195.
2. Everse J., Kaplan N.O. // *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1973. V. 37. P. 61–133.
3. Warburg O. // *Science.* 1956. V. 124. P. 269–270.
4. Hamanaka R.B., Chandel N.S. // *J. Exp. Med.* 2012. V. 209. P. 211–215.
5. Goldman R.D., Kaplan N.O., Hall T.C. // *Cancer Res.* 1964. V. 24. P. 389–399.
6. Koukourakis M.I., Giatromanolaki A., Sivridis E., Bougioukas G., Didilis V., Gatter K.C., Harris A.L. // *Br. J. Cancer.* 2003. V. 89. P. 877–885.
7. Fantin V.R., St.-Pierre J., Leder P. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. P. 425–434.
8. Le A., Cooper C.R., Gouw A.M., Dinavahi R., Maitra A., Deck L.M., Royer R.E., Vander Jagt D.L., Semenza G.L., Dang C.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 2037–2042.
9. Miao P., Sheng S., Sun X., Liu J., Huang G. // *IUBMB Life.* 2013. V. 65. P. 904–910.
10. Granchi C., Bertini S., Macchia M., Minutolo F. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. P. 672–697.
11. Granchi C., Paterni I., Rani R., Minutolo F. // *Future Med. Chem.* 2013. V. 5. P. 1967–1991.
12. Yu Y., Deck J.A., Hunsaker L.A., Deck L.M., Royer R.E., Goldberg E., Vander Jagt D.L. // *Biochem. Pharmacol.* 2001. V. 62. P. 81–89.
13. Choi S.R., Beeler A.B., Pradhan A., Watkins E.B., Rimoldi J.M., Tekwani B., Avery M.A. // *J. Comb. Chem.* 2007. V. 9. P. 292–300.
14. Dunn C.R., Wilks H.M., Halsall D.J., Atkinson T., Clarke A.R., Muirhead H., Holbrook J.J. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1997. V. 332. P. 177–184.
15. Read J.A., Winter V.J., Eszes C.M., Sessions R.B., Brady R.L. // *Proteins.* 2001. V. 43. P. 175–185.
16. Gerstein M., Chothia C. // *J. Mol. Biol.* 1991. V. 220. P. 133–149.
17. Ward R.A., Brassington C., Breeze A.L., Caputo A., Critchlow S., Davies G., Goodwin L., Hassall G., Greenwood R., Holdgate G.A., et al. // *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 3285–3306.
18. Dragovich P.S., Fauber B.P., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Ge H., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 3186–3194.
19. Fauber B.P., Dragovich P.S., Chen J., Corson L.B., Ding C.Z., Eigenbrot C., Giannetti A.M., Hunsaker T., Labadie S., Liu Y., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013. V. 23. P. 5533–5539.
20. Moorhouse A.D., Spiteri C., Sharma P., Zloh M., Moses J.E. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2011. V. 47. P. 230–232.
21. Kohlmann A., Zech S.G., Li F., Zhou T., Squillace R.M., Commodore L., Greenfield M.T., Lu X., Miller D.P., Huang W.S., et al. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 1023–1040.
22. Conners R., Schambach F., Read J., Cameron A., Sessions R.B., Vivas L., Easton A., Croft S.L., Brady R.L. // *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005. V. 142. P. 137–148.
23. Dunn C.R., Banfield M.J., Barker J.J., Higham C.W., Moreton K.M., Turgut-Balik D., Brady R.L., Holbrook J.J. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. P. 912–915.
24. Нилов Д.К., Прохорова Е.А., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 2 (25). С. 62–68.
25. ST(K/L) collection. Vitas-M Laboratory, Ltd, <http://www.vitasmilab.com>. 2012.
26. ACD/Spectrus DB, version 14.01. Advanced Chemistry Development, Inc., <http://www.acdlabs.com>. 2012.
27. Congreve M., Carr R., Murray C., Jhoti H. // *Drug Discov. Today.* 2003. V. 8. P. 876–877.
28. Lipinski C.A. // *Drug Discov. Today Technol.* 2004. V. 1. P. 337–341.
29. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model.* 2008. V. 48. P. 2371–2385.
30. Novikov F.N., Stroylov V.S., Stroganov O.V., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Mol. Model.* 2009. V. 15. P. 1337–1347.
31. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graphics.* 1996. V. 14.1. P. 33–38.
32. Swiderek K., Panczakiewicz A., Bujacz A., Bujacz G., Paneth P. // *J. Phys. Chem. B.* 2009. V. 113. P. 12782–12789.