

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Тольяттинский государственный университет»

Институт химии и энергетики

(наименование института полностью)

Центр медицинской химии

(наименование)

04.03.01 Химия

(код и наименование направления подготовки)

Медицинская и фармацевтическая химия

(направленность (профиль))

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА (БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА)

на тему Молекулярный дизайн ингибиторов RNF4

Обучающийся

М.В. Лесив

(Инициалы Фамилия)

(личная подпись)

Руководитель

д.х.н., доцент, З.П. Белоусова

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Консультант

А.Ю. Кудинов

(ученая степень (при наличии), ученое звание (при наличии), Инициалы Фамилия)

Аннотация

Целью данной работы является поиск новых рекрутеров E3-лигазы RNF4 среди библиотеки ковалентно-реактивных соединений с помощью методов молекулярного моделирования. Рекрутирование RNF4 представляет собой востребованную стратегию для разработки PROTAC (англ. Proteolysis-Targeting Chimera), которые при связывании с E3-убиквитинлигазой и белком индуцируют деградацию белка-мишени.

В литературном обзоре изложены подходы к ковалентному ингибированию активности ферментов, методы открытия ковалентных лигандов. Также описана стратегия направленного протеолиза в контексте использования технологии PROTAC. Освещены проблемы поиска новых лигандов E3-убиквитинлигаз и применение ковалентных рекрутеров этого класса белков на примере E3-убиквитинлигазы RNF4.

Во второй части описаны методика и результаты расчетных исследований, которые заключались в поиске кристаллической структуры, ее подготовке, проведении нативного и ковалентного докинга подготовленной библиотеки соединений и последующей оценке отобранных хитов с помощью других методов молекулярного моделирования.

Экспериментальная часть содержит подробное описание процессов подготовки структур мишеней и лигандов, протоколов ковалентного докинга, молекулярно-динамических исследований.

После проведения первичного виртуального скрининга и серии молекулярно-динамических симуляций было идентифицировано пять соединений-хитов, рекомендованных к *in vitro* оценке. Кроме того, показано, что все *in silico* манипуляции следует проводить именно на димерной структуре RNF4 для предотвращения получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Работа изложена на 156 страницах, содержит 56 рисунков, 7 таблиц и приложение.

Abstract

The title of the graduation work is Molecular design of RNF4 inhibitors.

The graduation work consists of an introduction, three chapters, 56 figures, 7 tables, a conclusion, the list of 85 references including foreign sources and appendices.

The aim of this graduation project is to search for new covalent ligands of the E3 ligase RNF4 using molecular modeling methods.

The object of the graduation work is the concept of covalent recruitment of E3 ligase for the development of PROTAC and subsequent degradation of the target protein.

The subject of the graduation work is the development of RNF4 ligands for the creation of PROTAC.

The graduation work may be divided into several logically connected parts which are literature review, results and their discussion and experimental part.

The first part describes in details the concept of covalent inhibition, methods for the discovery of covalent ligands, as well as the strategy of targeted proteolysis, the biological role of RNF4 and its participation in the ubiquitin-proteasome system involving PROTAC.

The second part dwells on the results of native and covalent docking of a library of compounds into the selected crystal structure of RNF4, as well as additional studies for selecting potential hits. Particular attention was paid to performing native docking into the monomeric and dimeric structures of RNF4.

The third part comprises methodology of computational studies. Based on the data obtained, we can conclude that 5 potential hits were found among the library of compounds, and the importance of using the dimeric structure of RNF4 for covalent docking was also shown.

Содержание

Введение.....	6
1 Литературный обзор	8
1.1 Стратегия ковалентного ингибирования в медицинской химии	8
1.1.1 Ковалентное ингибирование.....	9
1.1.2 Методы открытия ковалентных лигандов.....	14
1.2 Ковалентное рекрутирование RNF4 для приложений направленного протеолиза.....	22
1.2.1 Направленный протеолиз.....	22
1.2.2 Молекулярное строение и биологическая роль RNF4	24
1.2.3 Направленный протеолиз белков-мишеней при рекрутировании RNF4	26
2 Результаты и их обсуждение.....	31
2.1 Подготовка структуры белка и библиотеки лигандов	32
2.2 Докинг и симуляция молекулярной динамики нативного лиганда	36
2.3 Оценка аффинности связывания с помощью метода возмущения свободной энергии	46
2.4 Ковалентный докинг библиотеки соединений.....	48
2.5 Симуляция молекулярной динамики отобранных хитов.....	61
3 Экспериментальная часть.....	74
3.1 Компьютерное моделирование	74
Заключение	77
Список используемой литературы	79
Приложение А Результаты ковалентной стыковки	154
Приложение Б Отчеты молекулярно-динамической симуляции	87
Приложение В Результаты расчета относительной энергии связывания, полученные с помощью метода FEP	153

Определения, обозначения и сокращения

BRD4	бромодоменсодержащий белок 4
cIAP	ингибиторы апоптоза
c-Jun	белок комплекса активированного белка-1
CPM	7-диэтиламино-3-(4'-малеимидилфенил)-4-метилкумарин
CRBN	цереблон
CuAAC	медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение
DCAF	фактор ассоциации DDB1 и CUL4
EGFR	рецептор эпидермального фактора роста
fluorol- ABPP	профилирование белков на основе флуоресцентной поляризации активности
HTS	высокопроизводительный скрининг
IA	йодацетамид
IC ₅₀	концентрация полумаксимального ингибирования
MC/MC	тандемная масс-спектрометрия
MDM2	мышинный гомолог двойной минуты 2
Myc	протоонкогенный фактор транскрипции
Notch	белки-гомологи нейрогенного локуса notch, образующие сигнальный путь Notch
p-eIF2 α	фосфорилированный эукариотический фактор инициации трансляции 2 субъединица 1
POI	белок интереса
PROTAC	протеолиз, нацеленный на химеру
RFA	родамин
RMSD	среднеквадратичное отклонение
SDS- PAGE	PAGE электрофорез на полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
TCEP	трис(2-карбоксиэтил)фосфин
TEV	вирус табачной мозаики
TOP	тандемный ортогональный протеолиз
TPD	направленная деградация белков
TRSP1	трихоринофаланговый синдром 1-го типа
Ub	убиквитин
UPS	убиквитин-протеасомная система
VHL	супрессор опухолей фон Хипеля-Линдау
Wnt	гомолог протоонкогена int1
АТФ	аденозинтрифосфат

Введение

PROTACs – относительно новая терапевтическая стратегия, разрабатываемая в области направленной деградации биомолекул (в частности белков). Этот подход представляет собой применение гетеробифункциональных химерных молекул, содержащих в своем составе две боеголовки, соединенных линкером. Как правило, одна часть PROTAC направлена на соответствующую E3-лигазу, а вторая – на белок, подлежащий деградации.

Известно, что геном человека кодирует порядка 600 E3-убиквитинлигаз, которые представляют собой ферменты, способствующие переносу Ub на соответствующую мишень с образованием изопептидных связей. Важно отметить, что из них только около 20 может быть использовано для конструирования молекул PROTAC. Причиной этому является весьма сложный дизайн и отсутствие распространенных методов идентификации новых рекрутеров.

Конечно, нельзя упускать из внимания концепцию связывания боеголовок с белками интереса. На сегодняшний день научному сообществу известно достаточно большое число различных видов взаимодействий, однако стоит отметить, что особое место среди них занимают ковалентные связи. Благодаря реализации взаимодействий такого рода стала возможна целая стратегия ингибирования. Подобный подход в настоящее время является достаточно успешным и востребованным для изучения среди академических сообществ.

Поиск новых ковалентных ингибиторов позволит решить проблему использования менее 4% известных E3-убиквитинлигаз генома человека. А также станет возможным конструирование новых молекул PROTAC в целях развития TPD и UPS и противодействия самым сложным заболеваниям.

Подтверждением успешности подходов по открытию ковалентных ингибиторов является один из представителей E3-лигаз – RNF4 – для которого

был найден ковалентный рекрутер, в последствии использованный в создании деградеров.

Цель работы: поиск новых лигандов RNF4 среди небольшой домашней библиотеки (*англ.* library-in-house) ковалентно-реактивных молекул Центра медицинской химии с помощью методов молекулярного моделирования.

Задачи:

– выбор и подготовка белковых структур RNF4 и подготовка соединений, входящих в домашнюю библиотеку коллекции Центра медицинской химии;

– изучение способа связывания референсного лиганда CCW-16;

– проведение ковалентного докинга и молекулярно-динамической симуляции хитов.

1 Литературный обзор

1.1 Стратегия ковалентного ингибирования в медицинской химии

Ковалентные ингибиторы – это низкомолекулярные соединения, которые образуют ковалентную связь со специфическими белками-мишенями, таким образом подавляя их биологические функции. Они имеют большое количество преимуществ в качестве кандидатов для создания лекарственных препаратов [1, 2]. Основным отличием от нековалентных является способ связывания. Помимо таких взаимодействий, как водородные и ионные связи, Ван-дер-Ваальсовы, электростатические или гидрофобные, лиганды также образуют полноценную химическую ковалентную связь с мишенью.

Стратегии ковалентного ингибирования долгое время не уделялось должного внимания в академическом сообществе ввиду наличия обширного количества недостатков. Однако в последнее время все больше препаратов, используемых для лечения онкологических, кишечных и сердечных заболеваний, основаны на подходе ковалентного ингибирования для оказания терапевтического воздействия, что заставило медицинских химиков вновь обратить внимание на данную область. Сейчас разработка ковалентных ингибиторов является весьма популярным направлением современного молекулярного дизайна [3].

По статистике в 2021 году насчитывалось 4511 ковалентных ингибиторов, из них 68 представляют собой одобренные препараты [4]. Среди них примерно 28% используется для лечения онкологических заболеваний, 23% – при заболеваниях центральной нервной и сердечно-сосудистой системами, 21% – противомикробные и около 11% используются при желудочно-кишечных заболеваниях (рисунок 1) [5].

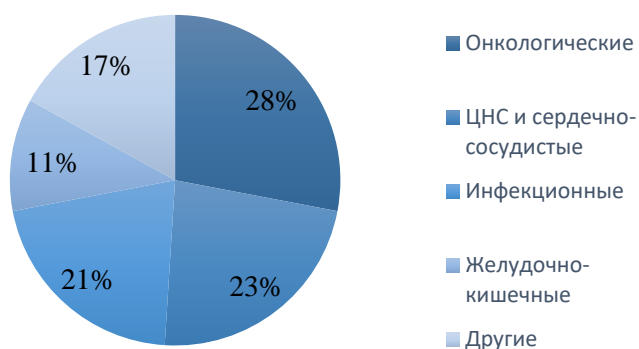


Рисунок 1 – Нозологическая классификация одобренных ковалентных препаратов

На момент 2024 года цифры несколько отличаются и база данных ковалентных ингибиторов насчитывает 8544 известных, среди которых также одобрено только 68 [6].

1.1.1 Ковалентное ингибирование

Изучение ковалентного ингибирования имеет длинную историю. Начиная с конца 19 века, стали появляться первые препараты, однако на тот момент их не выделяли в отдельную группу. Лишь в 1960-х годах было подробно описано, что представляют из себя ковалентные ингибиторы [7]. На рисунке ниже показана хронология развития и появления препаратов этого класса (рисунок 2). Самым известным среди них является аспирин. Дата его первого получения долгое время являлась спорной, однако все же была закреплена за 1899 годом [8].

Для начала стоит отметить, что ковалентные ингибиторы подразделяются на обратимые и необратимые.

Обратимый тип ингибирования представляет собой двухстадийный процесс, который начинается с приближения реактивного электрофильного фрагмента к реакционноспособному нуклеофильному остатку на поверхности белка с образованием обратимого нековалентного комплекса, который характеризуется константой диссоциации K_i . Образование ковалентной связи

происходит на втором этапе, характеризуется константой скорости k_2 и определяет скорость всего процесса, а время жизни ковалентного комплекса регулируется константой k_{-2} .

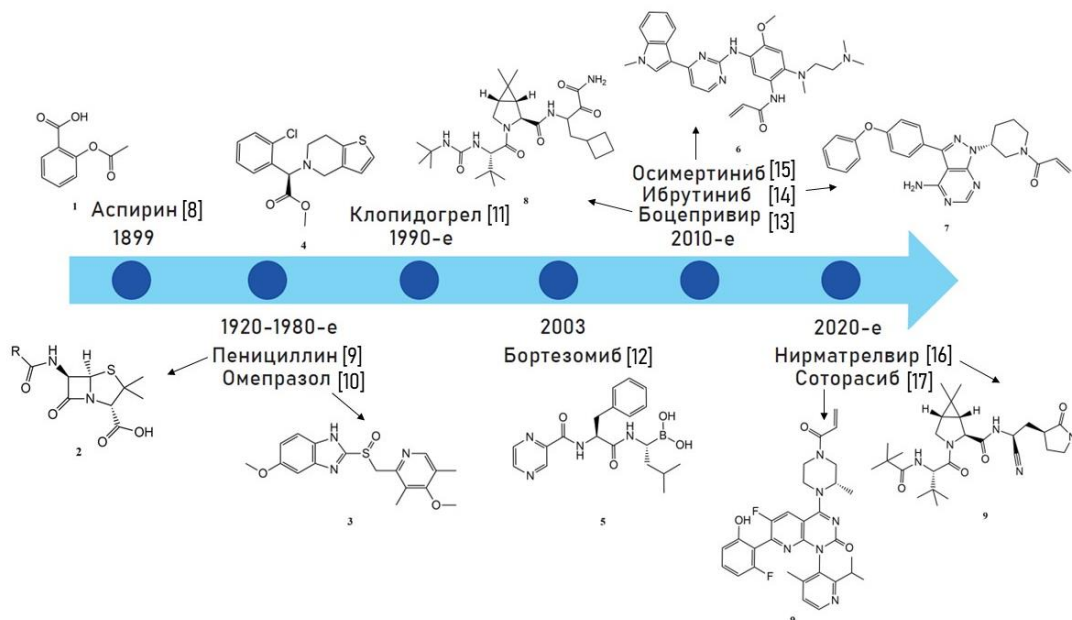


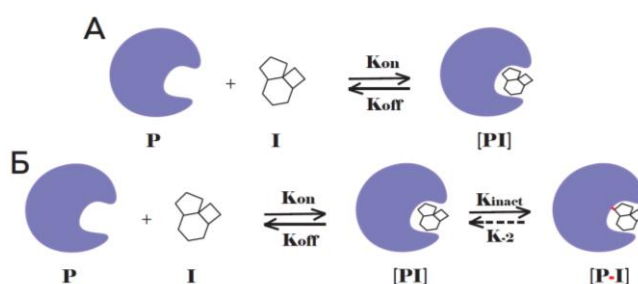
Рисунок 2 – Хронология открытия ковалентных ингибиторов

Необратимые ковалентные ингибиторы (инактиваторы) обеспечивают полную нейтрализацию активности биомолекул. Преимуществом такого ингибирования является длительный эффект, который сохраняется даже после снижения концентрации ингибитора, а самым главным недостатком – образование ковалентных связей со случайными мишенями. Для полностью необратимых ингибиторов k_{-2} приближенно к нулю или равно ему, поэтому целевое ингибирование регулируется K_i и k_{inact} (рисунок 3) [18-20].

Необратимые ковалентные ингибиторы тяжелее выводятся из организма и дольше оказывают на него влияние, поэтому рассчитать IC_{50} обычным способом достаточно сложно. Чаще всего ранжирование эффективности таких препаратов производят по значениям K_{inact}/K_i , которые выводят из зависящих от времени значений IC_{50} [21].

Из преимуществ ковалентного ингибирования по сравнению с

нековалентным можно выделить: увеличенную эффективность в следствие возможности необратимого связывания; увеличенную избирательность при связывании; высокую аффинность связывания с белками-мишенями, что позволяет увеличить продолжительность действия ингибитора; смягчение режимов дозирования, уменьшенная дозы приема; снижение резистентности. К недостаткам относятся: возможное влияние ковалентного взаимодействия на нормальное функционирование клеток из-за неспецифического связывания и токсичности [22].



А – нековалентное ингибирование; Б – обратимое и необратимое ковалентное ингибирование

Рисунок 3 – Процесс ковалентного ингибирования

Теперь стоит рассмотреть несколько конкретных кейсов, чтобы убедиться в преимуществах ковалентного ингибирования. Хорошим примером являются ингибиторы EGFR, среди которых известны гефитиниб, эрлотиниб и лапотиниб, применение которых приводит к возникновению резистентности. В отличие от них ковалентный афатиниб [23] (рисунок 4), открытый в 2013 году, имеет повышенную эффективность и продолжает ингибировать пролиферацию клеток при возникновении мутации в сайте. Однако изменение в ключевом аминокислотном остатке оказывает негативное влияние на связывание ковалентных ингибиторов с мишенью [24]. Другим хорошим примером является ибрутиниб [25] – препарат, нацеленный на тирозинкиназу Брутона (*англ.* ВТК, Bruton's tyrosine kinase), используемый для лечения В-клеточного рака, содержащий электрофильный акцептор Михаэля,

который ковалентно связывается с аминокислотным остатком Cys481 в киназном домене ВТК, что является распространенным методом разработки ковалентных препаратов.

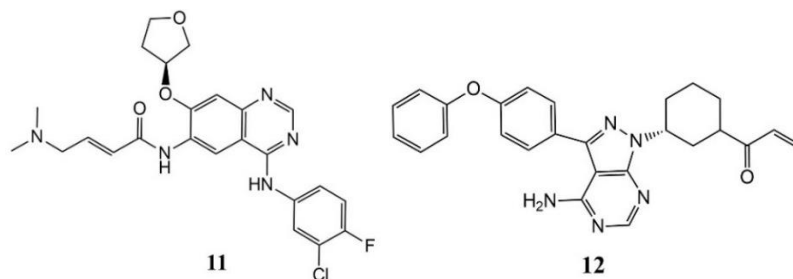


Рисунок 4 – Афатиниб (11) и Ибрутиниб (12)

В образовании ковалентной связи в мишенях со стороны белка участвуют нуклеофильно-реактивные аминокислоты, такие как цистеин, лизин, серин, треонин, тирозин и глутаминовая кислота. Наиболее характерной среди них является цистеин, благодаря наибольшей нуклеофильности по сравнению с другими аминокислотами. Со стороны лиганда участвуют такие боєголовки как гетероароматические циклы, α,β -ненасыщенные карбонильные соединения, акрилами́ды, нитрилы, цианоакрилаты, хлорацетильные и хлорацетамидные производные, эпоксиды и некоторые другие (рисунок 5) [26, 27].

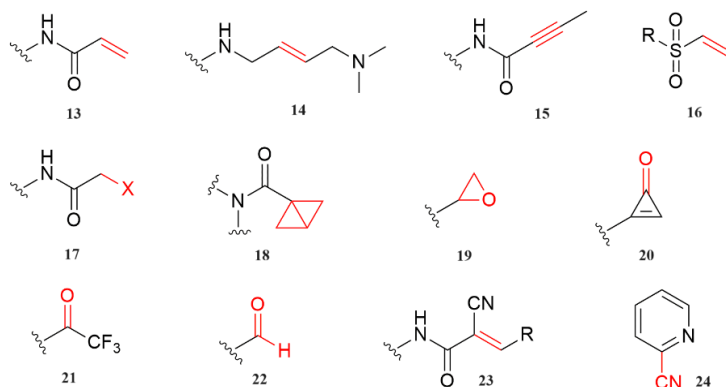


Рисунок 5 – Фрагменты, принимающие участие в образовании ковалентной связи

Взаимодействие аминокислотных остатков с реактивными бооголовками происходит под действием специфичных реакций. Наиболее известными и часто встречаемыми среди них являются присоединение по Михаэлю (рисунок 6) и нуклеофильное замещение.

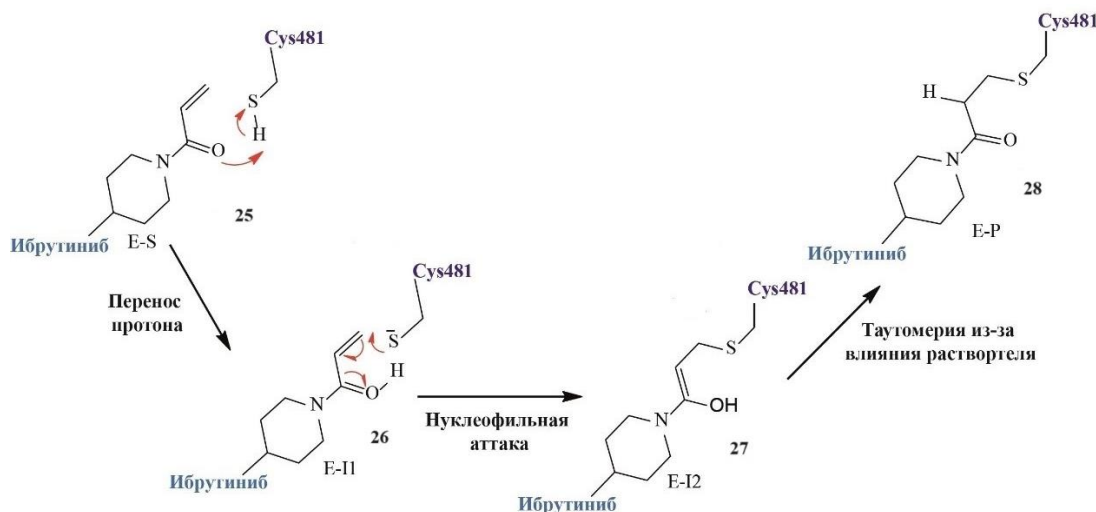


Рисунок 6 – Механизм связывания ВТК ибрутинибом

Остальные реакции взаимодействия, которые можно встретить в реальных кейсах, представлены в таблице 1 [28].

Таблица 1 – Основные реакции получения ковалентной связи

Тип реакции	Реактивные остатки
Присоединение по Михаэлю	Cys, Ser, Thr, Asp, Glu, Tyr
Нуклеофильное присоединение к двойной связи	
Нуклеофильное присоединение к тройной связи	
Нуклеофильное замещение	
Присоединение бороновой кислоты	
Раскрытие эпоксида	His, Cys, Ser, Thr, Asp, Glu, Tyr
Конденсация иминов	Lys, Asn, Gln, Arg
Сопряженное присоединение к алкену (активирован нитрилом)	Cys, Ser
Сопряженное присоединение к алкину (активирован карбонилем)	

1.1.2 Методы открытия ковалентных лигандов

Дизайн новых ковалентных ингибиторов остается сложной задачей. Обычный способ их открытия основывается на включении электрофила в структуру уже известного обратимого препарата. В настоящее время существует много инструментальных подходов и *in silico* методов, которые, однако, имеют свои недостатки, и все еще не позволяют с высокой точностью и скоростью определять новые успешные ковалентные ингибиторы [29].

Инструментальные методы

Методы обнаружения реакционноспособных белков

Прежде всего стоит обсудить используемые инструментальные методы для открытия новых ковалентных лигандов. Наиболее известным среди них является профилирование белков на основе активности (*англ.* ABPP, Activity based protein profiling), использующийся для характеристики активности ферментов в сложных протеомах и определения аффинности ковалентных лигандов на основе конкурентного вытеснения зондов. Впервые метод был открыт в конце 1990-х годов в работах Краватта и Бoggio, которые использовали зонды для специфической маркировки различных белков [30, 31].

Используемые химические зонды концептуально включают в себя три элемента: реактивную группу (боеголовку), взаимодействующую с белком, репортерную группу и соединяющий их линкер (рисунок 7).

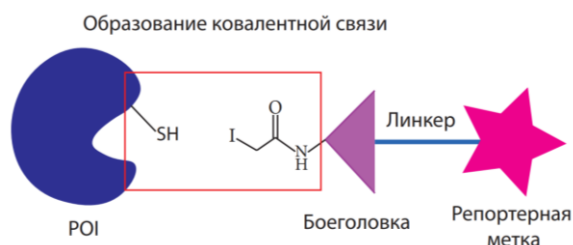


Рисунок 7 – Структура зондов, используемых в АВРР

Реакционноспособными группами чаще всего являются ковалентные реакционноспособные фрагменты, а репортерными – флуоресцентные красители, которые позволяют визуализировать меченые белки или биотин для их иммобилизации [32].

Однако классический АВРР имеет свои недостатки, поэтому были разработаны новые модификации метода, среди которых наиболее известным является isoTOP-ABPP, использующий тяжелую и легкие изотопные метки для идентификации связавшихся и не связавшихся с ними белков (рисунок 8).

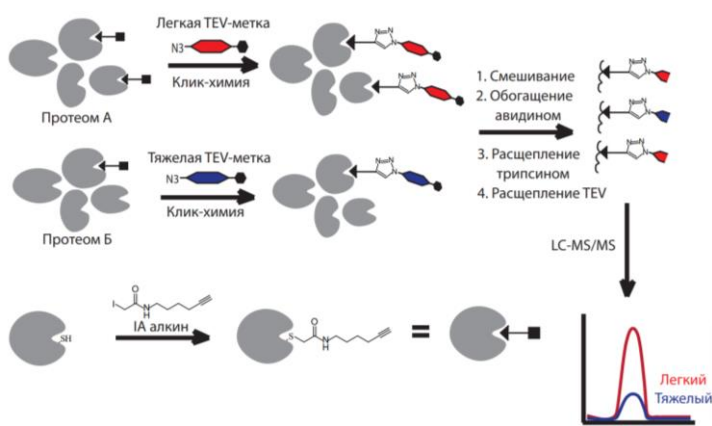


Рисунок 8 – isoTOP-ABPP [34]

isoTOP-ABPP позволяет проводить количественный и качественный анализ реактивности нативного цистеина, профилирование его реактивности в живых системах. Подробная структура субстрата представлена ниже (рисунок 9).

Как можно увидеть субстрат состоит из нескольких частей:

- электрофильный IA зонд для связывания остатков цистеина в белках;
- терминальный алкин для конъюгации белков с помощью реакции 1,3-диполярного азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемого CuAAC;
- функционализированный азидом пептид распознавания TEV-протеазой, содержащий биотин для обогащения стрептавидином

меченных зондом белков;

– изотопно-меченный валин для масс-спектрометрического измерения меченного IA пептида.

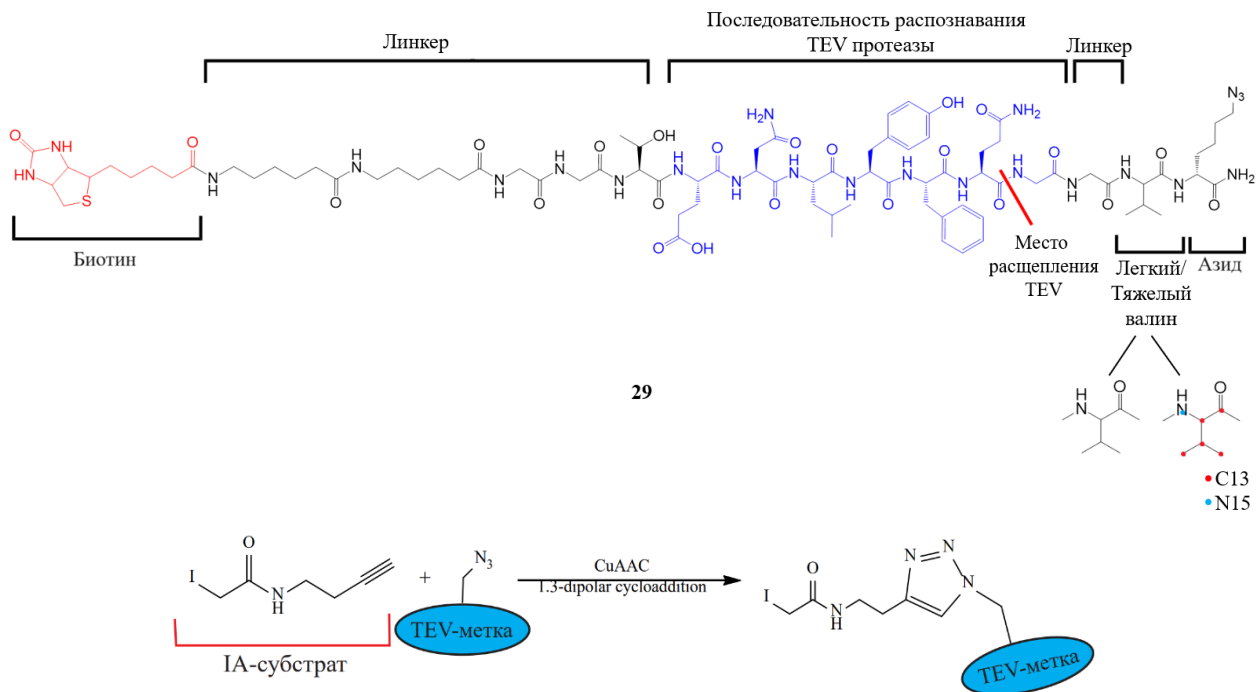


Рисунок 9 – Субстрат isoTOP-ABPP

Принцип проведения анализа заключается в следующем: протеомы обрабатывают зондом, содержащим алкин, а затем вводят TEV-биотиновую метку. Прореагировавшие белки обогащают стрептавидином и обрабатывают IA и восстановителем для восстановления и алкилирования всех цистеинтиолов в протеоме. После этого белки расщепляют трипсином, высвобождают, разделяют с помощью жидкостной хроматографии и анализируют с помощью тандемной MS/MS [33, 34].

Методы скрининга лигандов и определения их аффинности

Помимо описанных выше методов поиска активных белков в медицинской химии часто прибегают к скрининговым форматам анализов для разработки стабильных и эффективных ингибиторов ферментов. Именно таким и является fluorol-ABPP, открытый в 2009 году с целью устранить

недостаток считывания результатов с помощью SDS-PAGE.

В основу метода легла поляризация флуоресценции, по которой выдвинули предположение, что реакция между зондом, основанном на активности малых молекул, и ферментом приведет к зависимому от времени увеличению сигнала поляризации флуоресценции, и это позволит проследить за ферментативной активностью в режиме реального времени. Сам анализ проводили между очищенным рекомбинантным белком и зондом, основанном на серингидролазной активности, в присутствии RFA (рисунок 10) [35]. В дальнейшем метод был улучшен за счет создания нового формата fluorol-ABPP совместимого с HTS [36].

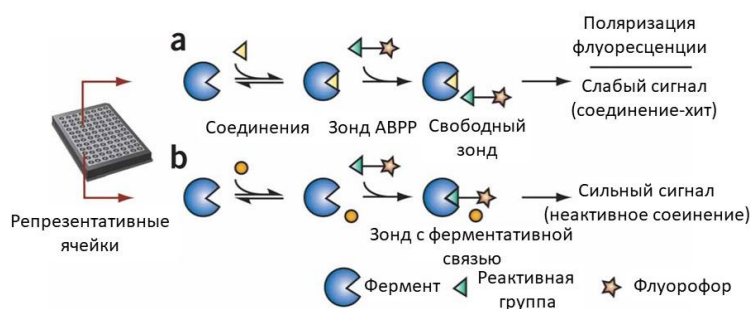


Рисунок 10 – Схема метода fluorol-ABPP

Еще одним удобным инструментальным методом является высокопроизводительный флуоресцентный анализ. Он используется для скрининга ковалентных фрагментов, связывающих реактивность белка с внутренней электрофильностью лигандов. Для измерения кинетики конъюгации электрофил-тиол была разработана количественная необратимая привязка (*англ.* qIT, quantitative Irreversible Tethering), основанная на флуорогенной количественной оценке тиола (*англ.* FTQ, Fluorogenic Thiol Quantification). В качестве зонда в этом методе используется CPM, так как обладает высокой стабильностью. В качестве восстановителя используется ТСЕР-агароза, представляющая собой иммобилизованный восстановитель (рисунок 11).

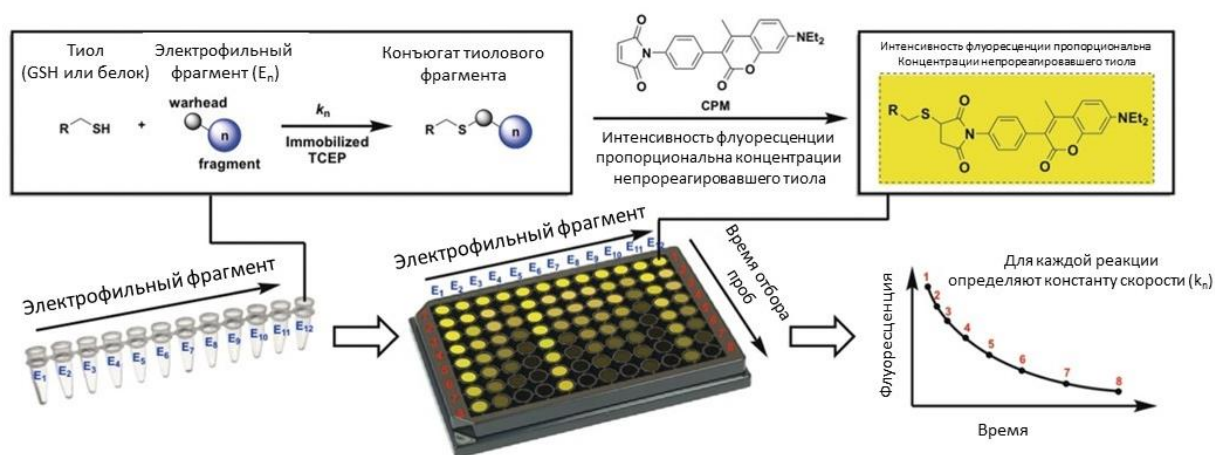


Рисунок 11 – Проведение qIT-анализа

Сам анализ заключается во взаимодействии целевой тиольной группы цистеина с электрофильным фрагментом в присутствии TCEP-агарозы. За ходом реакции следят измерением остаточной целевой концентрации тиола с использованием флуорогенного зонда CPM, а константы скорости получают с помощью регрессионного анализа [37].

Подходы *in silico*

Молекулярное моделирование – компьютерные подходы, позволяющие имитировать поведение, структуру и свойства молекулы или молекулярной системы в трехмерном пространстве [38]. Одним из основных методов молекулярного моделирования является молекулярный докинг, который используется для моделирования взаимодействия между малой молекулой и белком на атомном уровне. Это позволяет оценить поведение лигандов в сайте связывания мишеней и выяснить основные биохимические процессы, проходящие между ними [39].

Частным случаем молекулярного докинга является ковалентная стыковка – подход, обеспечивающий удобство дизайна ковалентных ингибиторов. Процесс проводится с помощью алгоритма, применяемого во всех случаях докинга: отбирается мишень и библиотека соединений, для которых определяется предпочтительный способ связывания, затем белок и

лиганды подвергаются подготовке. После этого проводят ковалентную или молекулярную стыковку с последующим анализом хитов.

Несмотря на актуальность докинга в целом, важно понимать, что он далек от совершенства и имеет свои недостатки. Так, все результаты, полученные в ходе стыковки, стоит воспринимать, как отправную точку для дальнейших исследований, а не как конечный результат. Причиной этого является большое количество аппроксимаций, которые влияют на получение точных результатов энергии связывания, а также отсутствие подходящих функций оценки или алгоритма поиска, которые способны сочетать в себе точность и скорость [43].

В настоящее время существует несколько алгоритмов, которые были разработаны для идентификации ковалентных ингибиторов: AutoDock [41], CovDock [42], FITTED [43], GOLD [44] и ICM-Pro [45]. Помимо этого, некоторые исследовательские группы реализовали возможность проведения ковалентного докинга с использованием веб-серверов, одним из которых является Docking Server [46], позволяющий провести анализ отдельных лигандов или целой библиотеки, а также выполнить оценку полученных результатов стыковки [47].

AutoDock прогнозирует взаимодействие лигандов с макромолекулярными мишенями. Типичный расчет представляет собой двухэтапный процесс: сначала рассчитывается карта потенциалов взаимодействия с использованием серии атомов-зондов, которая затем используется во время конформационного поиска для ускорения оценки энергии лиганда. AutoDock реализует два подхода, которые различаются способом моделирования соединений. Первый – метод гибкой боковой цепи (*англ.*, flexible side-chain) – лиганды ковалентно присоединяются к мишени в произвольной конформации, а затем осуществляется гибкая минимизация. Подобный подход применяется также в других алгоритмах, таких как GOLD. Другой метод – двухточечного аттрактора (*англ.*, two-point attractor) – использует измененные карты взаимодействий и модифицированные типы

атомов. Боковая цепь целевого аминокислотного остатка удаляется, чтобы убрать пару атомов, которые соединены с алкилирующим лигандом. Затем выполняется анализ стыковки путем присвоения особого типа атома – X и Z – в лиганде для атома, который образует ковалентную связь. Для них создаются специализированные карты взаимодействия с потенциалом Гаусса (Z-потенциал), который присваивает штрафы позам, где атомы X и Z находятся за пределами образования ковалентной связи, способствуя правильному расположению лиганда.

При оценке методов было выяснено, что метод гибких остатков обеспечивает большую точность, чем метод двухточечного аттрактора [41].

Основываясь на необходимости новых подходов и сложностях, возникающих при использовании других вычислительных инструментов для проведения ковалентного докинга, был разработан CovalentDock. Новая программа была реализована на алгоритмах, применимых в AutoDock, а рабочий процесс аналогичен обычному молекулярному докингу. Суть CovalentDock заключается в использовании временного фиктивного атома, который добавляется к лиганду во время предварительной обработки и отвечает за формирование ковалентной связи между лигандом и рецептором. Оценка производится с помощью потенциала Морзе, параметризованного для конкретной интересующей реакции [48].

Однако на сегодняшний день наиболее известным и успешным методом является CovDock, который преодолевает трудности, возникающие при использовании других программ: автоматическое обнаружение различных реактивных групп в скрининговой библиотеке, устранение необходимости ручной модификации структуры белка или лигандов, обобщенная функция оценки, которая не моделирует энергию образования связи напрямую, но неявно учитывает вклад ковалентной связи.

Рабочий процесс CovDock протекает в пять этапов:

1. нековалентная стыковка. Изначально проводится подготовка лиганда с отбором трех самых низкоэнергетических форм для стыковки (стоит

учитывать, что лиганд должен находиться не дальше, чем на 8 Å от реакционноспособного остатка рецептора, а энергия позы не должна превышать отклонение 2.5 ккал/моль от наименьшего показателя). Во избежание ошибок, перед началом докинга реактивный остаток рецептора модифицируют в аланин;

2. реактивный остаток мутируют обратно в исходную аминокислоту и выбирают конформацию боковой цепи рецептора с использованием библиотеки ротамеров. Важно, чтобы расстояние между атомами, образующими ковалентную связь, не превышало 5 Å;

3. образование ковалентной связи происходит с изменениями порядка связи, протонирования и так далее. Если реакция может привести к появлению нескольких стереоизомеров, то все они сохраняются для дальнейшей оптимизации;

4. уточнение. Полученные комплексы минимизируют в вакууме для исправлений стерических столкновений и восстановления нормальных длин связей. Затем позы группируют по декартовым координатам и минимизируют с последующим выбором вероятной геометрии связывания;

5. оценка аффинности проводится с помощью эмпирической скоринговой функции, представляющей собой усредненный показатель, учитывающий взаимодействие лиганда до и после образования ковалентной связи.

На рисунке 12 представлен общий процесс проведения CovDock.

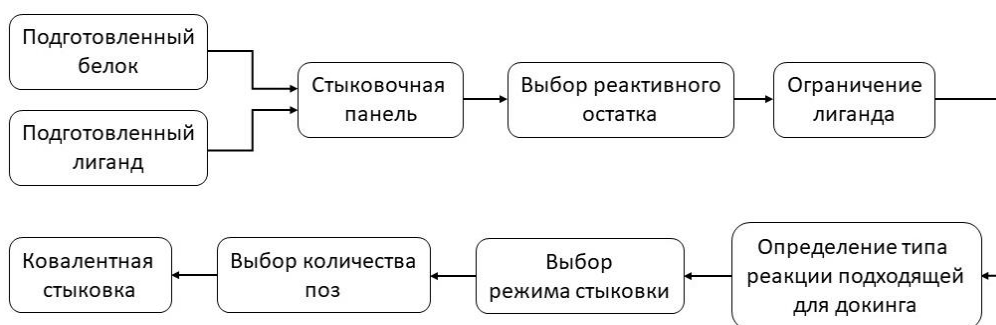


Рисунок 12 — Процесс проведения CovDock

Эффективность прогнозирования позы CovDock сравнивалась с методом CovalentDock. По результатам первый алгоритм превосходил второй, что подтверждается значениями RMSD, составляющими 1.8 Å и 3.4 Å соответственно [42].

Однако несмотря на все свои преимущества CovDock не облегчает виртуальный скрининг на основе структуры (*англ.* SBVS, Structure-based virtual screening) из-за сложности вычислений, поэтому была разработана модифицированная версия CovDock-VS. Этапы проведения рабочего процесса аналогичны классическому варианту CovDock, но имеют некоторые видоизменения [49].

1.2 Ковалентное рекрутирование RNF4 для приложений направленного протеолиза

1.2.1 Направленный протеолиз

Целенаправленная деграция белка – активно развивающаяся стратегия, одним из основных путей которой является UPS. Механизм UPS представляет собой сложный и строго регулируемый процесс, состоящий из двух последовательных этапов: убиквитинилирования и деграции белка протеасомой. Весь процесс запускается благодаря действию Ub, который помечает субстраты для протеолиза. Он представляет собой высококонсервативный полипептид, состоящий из 76 аминокислот [50, 51].

Начинается деграция со связывания целевого белка с Ub, протекающего в три стадии. Сначала Ub связывается с остатком цистеина убиквитин-активирующего фермента E1 через концевой глицин АТФ-зависимым образом. Затем активированный Ub переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент E2 с образованием тиоэфирной связи. После этого происходит связывание E2 с убиквитинлигазой E3, которая действует как фермент рекрутирования субстрата и переносит Ub к остатку лизина целевого белка [52, 53].

Необходимым компонентом для убиквитин-зависимой деградации белка является протеасома 26S. По сути, это большой белок, представляющий собой ферментативный АТФ-зависимый комплекс, состоящий из 40 субъединиц и отвечающий примерно за 80% деградации белков в клетке.

Интересной и относительно новой стратегией в области ТРД является PROTACs, которые представляют собой гетеробифункциональные молекулы, состоящие из боеголовок, нацеленных на интересующий белок, и лигандов, рекрутирующих убиквитинлигазу E3, которые соединены между собой линкером (рисунок 13). За счет действия PROTAC происходит образование тройного комплекса, который включает в себя E3-лигазу, PROTAC и POI. Таким образом PROTAC индуцирует деградацию целевого белка, специфически связываясь как с POI, так и с E3-лигазой [54].

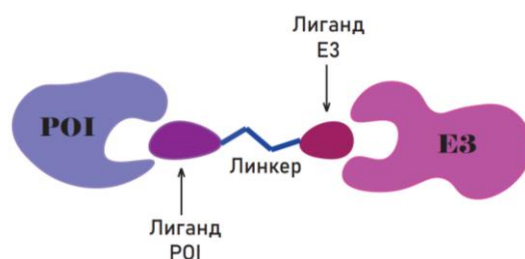


Рисунок 13 – Тройной комплекс POI-PROTAC-E3

В норме связывание между белком-мишенью и E3-лигазой реализуется за счет наличия в POI дегронов, которые представляют собой специальные участки селективные к определенным лигазам [55]. Важно отметить, что использование стратегии PROTAC является удобной и выгодной благодаря их использованию в низких концентрациях, повторному участию в протеолитической деградации, устранению ферментативных функций и их способности подвергаться деградации чужеродные друг другу POI и E3-лигазы [56]. Кроме того, PROTAC является одной из действующих стратегий против нацеливания на «неуловимые» протеомы, представляющие собой белки, неспособные ингибироваться малыми молекулами, такими как

транскрипционные факторы, каркасные белки и так далее. [57, 58]

1.2.2 Молекулярное строение и биологическая роль RNF4

В данной работе мы решили сконцентрироваться на разработке лигандов RNF4, поэтому считаю необходимым рассмотреть молекулярное строение и биологическую роль этой E3-лигазы.

RNF4 (англ. Really Interesting New Gene Finger Protein 4) представляет собой ген, расположенный на хромосоме 4p 16.3 человека и кодирующий белок массой 21 кДа, который содержит в своей структуре домен безымянного пальца RING. Подобные богатые цистеином домены в основном принимают участие в белок-белковых взаимодействиях [59].

Белок млекопитающих RNF4 является димерной E3-лигазой, которая нацелена на убиквитинилирование рецепторов, связанных с малыми убиквитинподобными модификаторами SUMO (англ. Small Ubiquitin-like Modifier). За счет наличия в структуре нескольких мотивов SUMO-взаимодействия (англ. SIM, SUMO-interacting motive) и вышеупомянутого домена RING, RNF4 способен распознавать поли-SUMO цепи. На рисунке 14 представлено строение RNF4-лигазы.



Рисунок 14 – Строение RNF4 (PDB ID: 4PPE [60])

C-концевой домен RING содержит в своем составе два атома цинка и отвечает за димеризацию и рекрутирование E2-фермента, а также является необходимым для активности E3-лигазы, а N-концевой домен содержит 4

мотива SIM, которые обеспечивают специфичность связывания с субстратами, содержащими poly-SUMO цепи [61].

Для RNF4 характерны два основных исхода убиквитинилирования. В первом случае происходит сборка комплекса лигазы, RNF4 связывается с E2, несущей Ub, и с SUMO, что влечет за собой образование димерного комплекса (рисунок 15). Связывание SUMO с белком-субстратом представляет собой посттрансляционную модификацию, что способствует каталитическому действию при убиквитинилировании. Далее нуклеофил, атакует тиоэфирную связь с активным центром E2. Этот процесс влечет перенос Ub на субстрат и дальнейший запуск деградации. Другой случай заключается в аутоубиквитинилировании RNF4. Это происходит, когда отсутствует субстрат-мишень. Тогда RNF4 способствует присоединению Ub к внутренним остаткам Lys [62, 63].

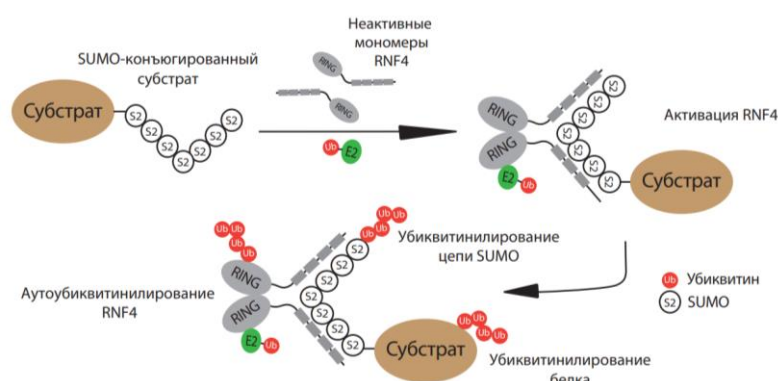


Рисунок 15 – Субстрат-опосредованная активация RNF4

В основном убиквитинилирование нацелено на белки для их деградации, в случае RNF4 оно может стабилизировать онкогенные факторы транскрипции, такие как β -катенин, Мус, c-Jun и белок внутриклеточного домена Notch (N-ICD) путем фосфорилирования субстрата, что показано на рисунке ниже, а также регулирует Wnt-зависимую передачу сигнала (рисунок 16) [64].

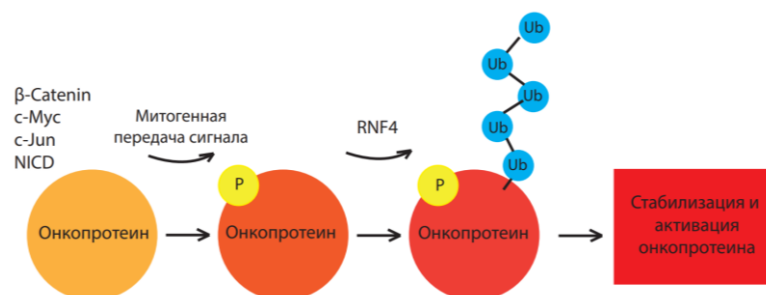


Рисунок 16 – RNF4-зависимый сигнальный путь

RNF4 может способствовать онкогенезу, что вызывает устойчивость в клетках меланомы к таргетной терапии. Такие свойства возникают в результате связывания, убиквитинилирования, стабилизации и повышения уровня p-eIF2 α , а также за счет стабилизации c-Jun, c-Myc, которые связаны с ядерной меланомой [65].

Также было установлено, что RNF4 может принимать участие в координации активности транскрипционных сигналов вышестоящих факторов, в том числе TRSP1 [66].

1.2.3 Направленный протеолиз белков-мишеней при рекрутировании RNF4

Начать данный раздел стоит с освещения проблемы поиска новых E3 лигаз, которые могли бы быть использованы для задач TPD, а также конструирования лигандов к ним. Несмотря на то, что геном человека кодирует около 600 убиквитинлигаз, только около 20 из них используются медицинскими химиками при конструировании PROTAC. Причиной этому является отсутствие универсальных стратегий идентификации и дизайна новых рекрутеров – и действительно, большая часть известных на сегодняшний день малых молекул, способных нацеливаться на E3, были обнаружены случайно (например, талидомид **30** [67], рекрутер CRBN, нутлин-3 **31** – лиганд MDM2 [68], LCL-161 **33** – для cIAP [69]). Лишь только лиганды VHL были получены в ходе направленного *de novo* конструирования на основе нативных дегронов [70]. Здесь, однако, стоит отметить, что и такой

подход не универсален и крайне редко описывается в литературе по причине слабой изученности клеточных функций большей части E3 (рисунок 17).

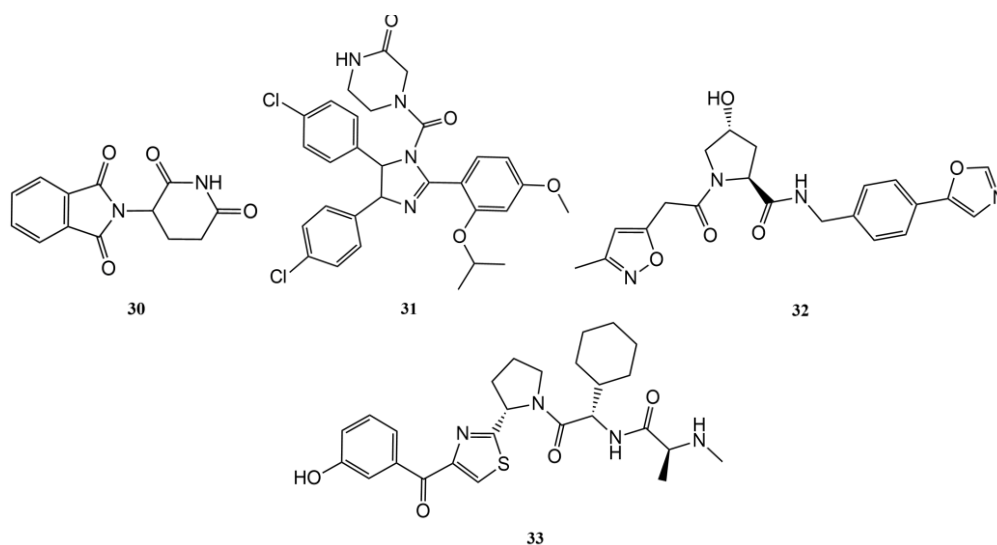


Рисунок 17 – Известные лиганды для CRBN (30), MDM2 (31), VHL (32) и cIAP (33)

В 2019 году научная группа под руководством Д. Номуры попыталась решить проблему поиска новых лигандов E3 с помощью подходов ковалентного ингибирования. Коллеги выполнили масштабное профилирование протеома E3 лигаз с помощью подходов isoTOP-ABPP с целью выявить белки, содержащие реактивные остатки Cys, на которые могли бы нацелиться будущие лиганды. Среди таких убиквитинлигаз была и RNF4. Позже тот же коллектив опубликовал работу [71], в которой привели полные результаты профилирования. Некоторые из содержащих реакционноспособные цистеины E3 представлены в таблице ниже (таблица 2).

В ходе исследования, посвященного открытию рекрутеров RNF4, Номура и коллеги провели скрининг библиотеки малых молекул, содержащих различные ковалентные боеголовки, используя подход ABPP в геле с применением флуоресцентного IA-родаминового зонда. Все соединения библиотеки в среднем имели небольшой размер/молекулярную массу (до 350-400 Да) и содержали либо хлорацетамидную, либо акриламидную

боголовку в качестве реакционноспособной группы, связанную с ароматическими ядрами.

Таблица 2 – Репрезентативный список реактивных цистеинов в E3-лигазах

E3 лигаза	Реакционный цистеин	E3 лигаза	Реакционный цистеин
RNF114	Cys8, Cys110	VHL	Cys77
RNF4	Cys132/Cys135	RNF2	Cys72
DCAF16	Cys177, Cys179	RNF14	Cys262, Cys417
DCAF11	Cys460	RNF20	Cys383, Cys905, Cys924
CRBN	Cys188, Cys287	RNF167	Cys271
RNF25	Cys316	RNF126	Cys32
RNF31	Cys504, Cys551	RNF213	Cys614

Структуры **34**, **35** и **36** были идентифицированы авторами как потенциальные хиты (рисунок 18). Однако, согласно блотту с серебряным окрашиванием, **35**, вероятно, вызывает осаждение белка, а дополнительные тесты на клеточной линии 213MPF показали, что **34** оказался неселективным. Таким образом, **36** был выбран в качестве лиганда для дальнейшей модификации.

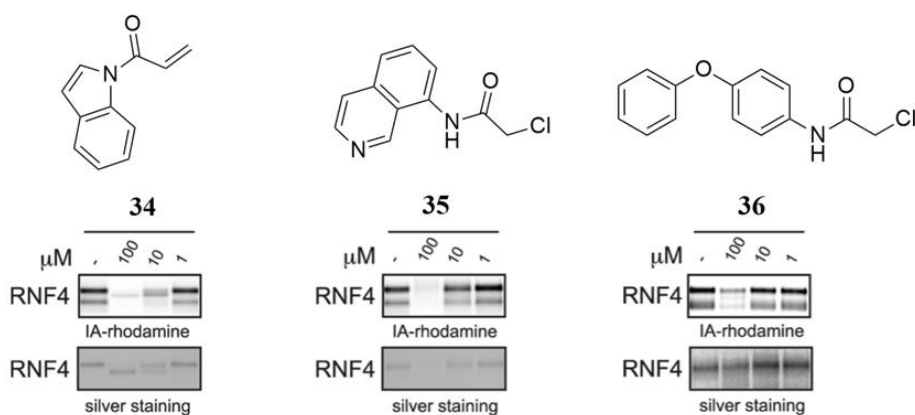


Рисунок 18 – Структуры **34**, **35** и **36**, как потенциальные хиты

Анализ ковалентного аддукта RNF4-TRH-1-23 показал, что связывание лиганда происходит за счет образования связей либо с остатком Cys132, либо

Cys135.

Дальнейшая SAR-оптимизация, направленная в основном на модификацию дальнего ароматического фрагмента, позволила выявить CCW-16, также содержащего замещенный бензилом атом азота хлорацетамидной боеголовки, в качестве соединения-лидера (рисунок 19). CCW-16 оказался способен дозозависимо ингибировать IА-родаминовое мечение белка интереса, продемонстрировав $IC_{50} = 1.8 \mu\text{Моль/л}$.

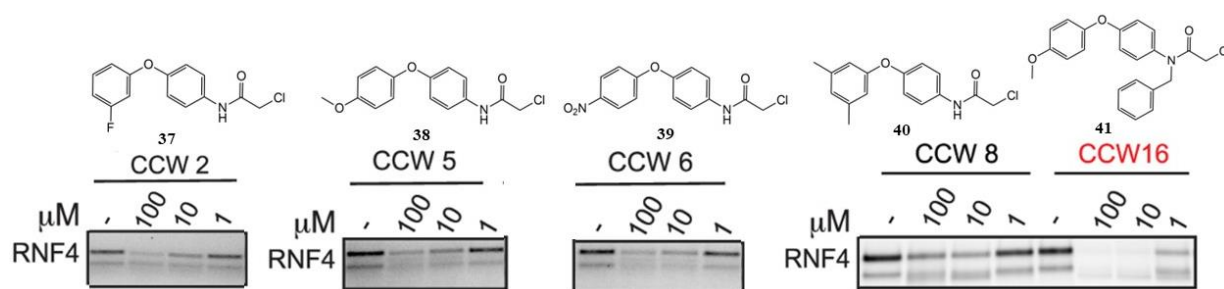


Рисунок 19 – SAR-оптимизация, приводящая к хиту CCW-16

Как можно заметить, все соединения оказываются способны связываться с RNF4, однако, взглянув на практически полный аналог CCW-16 – CCW-5 – можно сделать вывод о важности бензильного заместителя. К сожалению, авторами не было проведено SAR-исследование, направленное предмет модификацию ароматического кольца *N*-Вп фрагмента. Для визуальной оценки связывания лиганда с RNF4 была проведена ковалентная стыковка CCW-16, где он связывался с Cys132 или Cys135 с использованием общедоступной кристаллической структуры RNF4 (PDB ID: 4PPE [60]). Обе модели показали, что CCW-16 связывается с RNF4 без явных полярных взаимодействий. Дифенилэфирный мотив удобно укладывается в неполярную бороздку на поверхности белка, выстланную остатками Ala174, Phe162, Cys177, Pro178 и Cys180. Авторы подчеркнули, что цинк может координироваться тремя оставшимися остатками цистеина, а связывание происходит за пределами координирующего цинк сайта (рисунок 20).

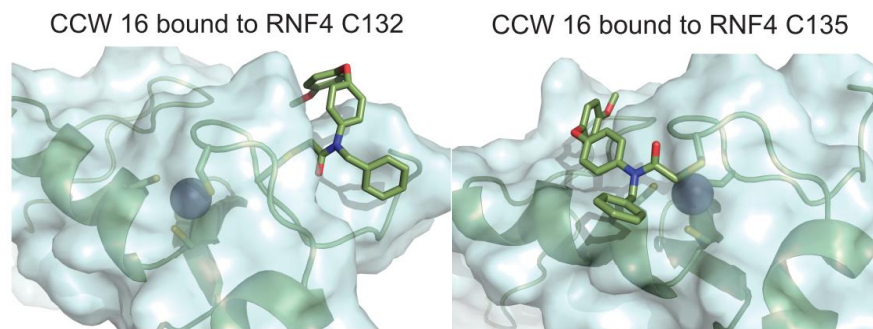


Рисунок 20 – Модель стыковки CCW-16

Для подтверждения возможности использования CCW-16 для задач TPD, был разработан деградер CCW 28-3 (рисунок 21), нацеленный на BRD4 и содержащий JQ1 в качестве рекрутера POI [72]. Полученный PROTAC был способен вызывать уверенное снижение уровней BRD4 уже при 1 μ Моль/л.

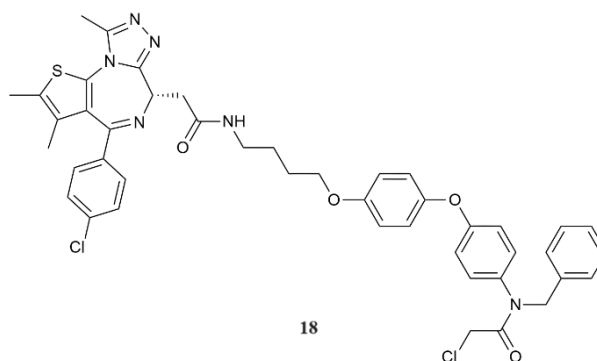


Рисунок 21 – Деградер CCW 28-3

Все вышеизложенное показывает, что стратегия ковалентного рекрутирования может быть применена для поиска и дизайна новых лигандов E3. Расширение спектра рекрутируемых лигаз является важной задачей в области TPD из-за увеличения набора деградируемых POI, обеспечения тканевой селективности, повышения эффективности деградации уже известных мишеней.

2 Результаты и их обсуждение

Как уже упоминалось выше, рекрутирование E3-лигаз чрезвычайно важно в области TPD, однако на сегодняшний день разработка новых лигандов с помощью рационального структурно-ориентированного дизайна практически невозможна.

Тем не менее, было показано, что подходы к открытию ковалентных лекарств могут решить эту проблему. RNF4 представляет собой одну из E3-лигаз, для которых как раз и был найден ковалентный рекрутер, затем успешно использованный в создании различных деградеров.

Дизайн исследования представлен на рисунке ниже. На первом этапе был произведен анализ доступных в PDB (*англ.* Protein Data Bank) [73] кристаллических структур мишени интереса и выбор среди них пригодной для дальнейшей работы. Отобранная модель белка подготавливалась, а затем использовалась для ковалентной стыковки референсного лиганда. Полученные комплексы дополнительно подвергались короткой 60-наносекундной симуляции молекулярной динамики. Соединения, входящие в библиотеку для скрининга, также готовились и ковалентно стыковались. Исходя из анализа результатов докинга, обнаруженные хиты были проверены на стабильность в ходе молекулярно-динамического исследования (рисунок 22).

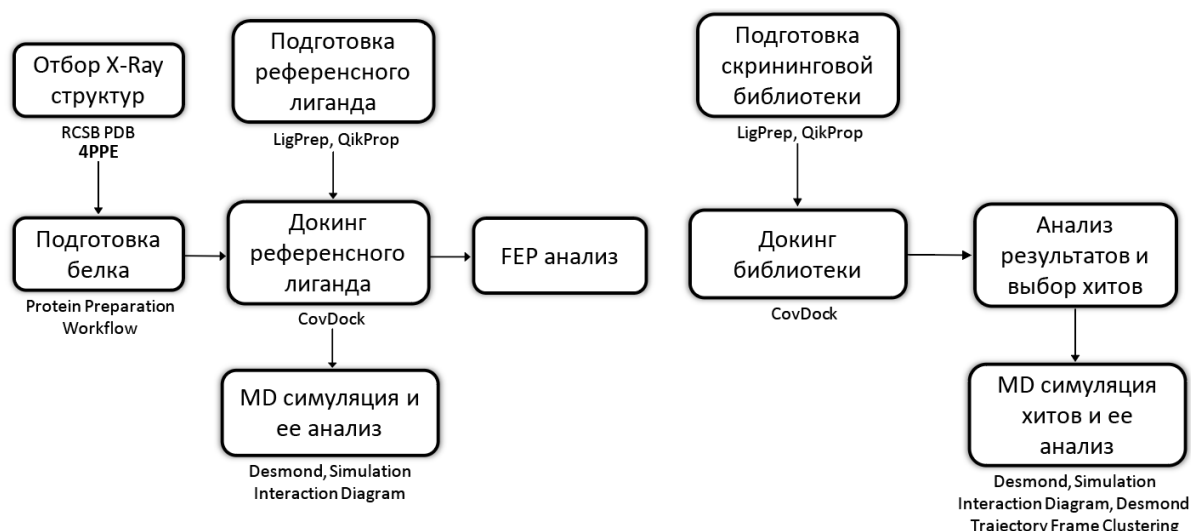


Рисунок 22 – Дизайн исследования

2.1 Подготовка структуры белка и библиотеки лигандов

PDB содержит восемь записей, включающих интересующую нас лигазу отдельно или в составе белок-белкового комплекса. Среди них, однако только одна – 4PPE – удовлетворяет медико-химическим требованиям к качеству структуры, а именно обладает приемлемыми значениями разрешения $\leq 2.5 \text{ \AA}$, R_{free} -фактора < 0.30 , представляет собой человеческий протеин (таблица 3).

Таблица 3 – Характеристика структур RNF4, содержащихся в PDB

PDB ID	Метод	Разрешение, \AA	Организм-источник	R_{free}
4PPE	РСА	2.00	<i>Homo sapiens</i>	0.280
3NG2	РСА	1.80	<i>Rattus norvegicus</i>	0.242
2MP2	ЯМР	–	<i>Homo sapiens, Mus musculus</i>	–
2EA6	ЯМР	–	<i>Homo sapiens</i>	–
2XEU	РСА	1.50	<i>Homo sapiens</i>	0.197
4AP4	РСА	2.21	<i>Homo sapiens, Rattus norvegicus</i>	0.242
5AIU	РСА	2.21	<i>Rattus norvegicus, Homo sapiens</i>	0.255
5AIT	РСА	3.40	<i>Rattus norvegicus, Homo sapiens, Bos taurus</i>	0.286

Данный комплекс был загружен и подготовлен с помощью модуля

Protein Preparation Workflow [74], включенного в пакет ПО Schrodinger Suite. Цинк, координированный в домене цинкового пальца остатками Cys136, 139, 163, 166 был предварительно удален. Структура не содержала серьезных ошибок вроде отсутствующих боковых цепей, петель или остатков, имеющих альтернативные ориентации. Были добавлены атомы водорода, уточнены некоторые порядки связей, выполнено удаление всех молекул воды, а также ограниченная минимизация протонов.

Соединения, входящие в домашнюю библиотеку коллекции Центра медицинской химии, представляют собой потенциально ковалентно-активные лиганды, включающие хлорацетамидный фрагмент в качестве реактивной боеголовки. Всего библиотека содержала 35 структур (рисунки 23 и 24).

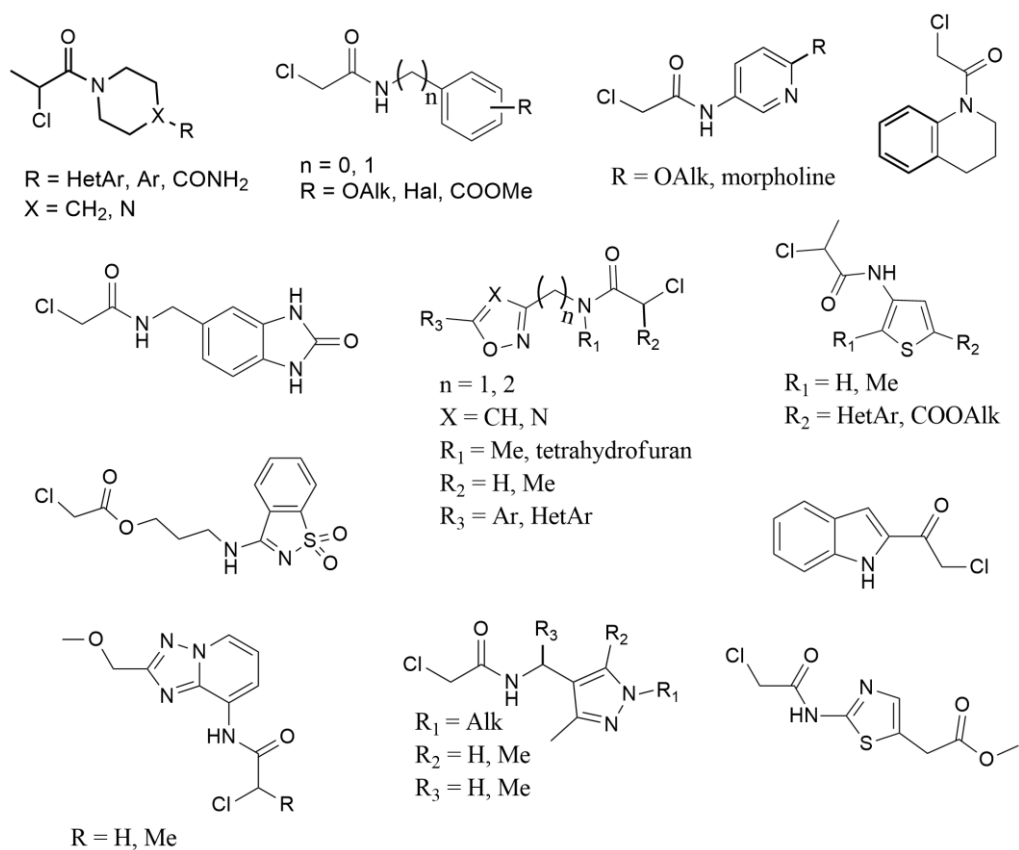


Рисунок 23 – Домашняя библиотека ковалентных лигандов

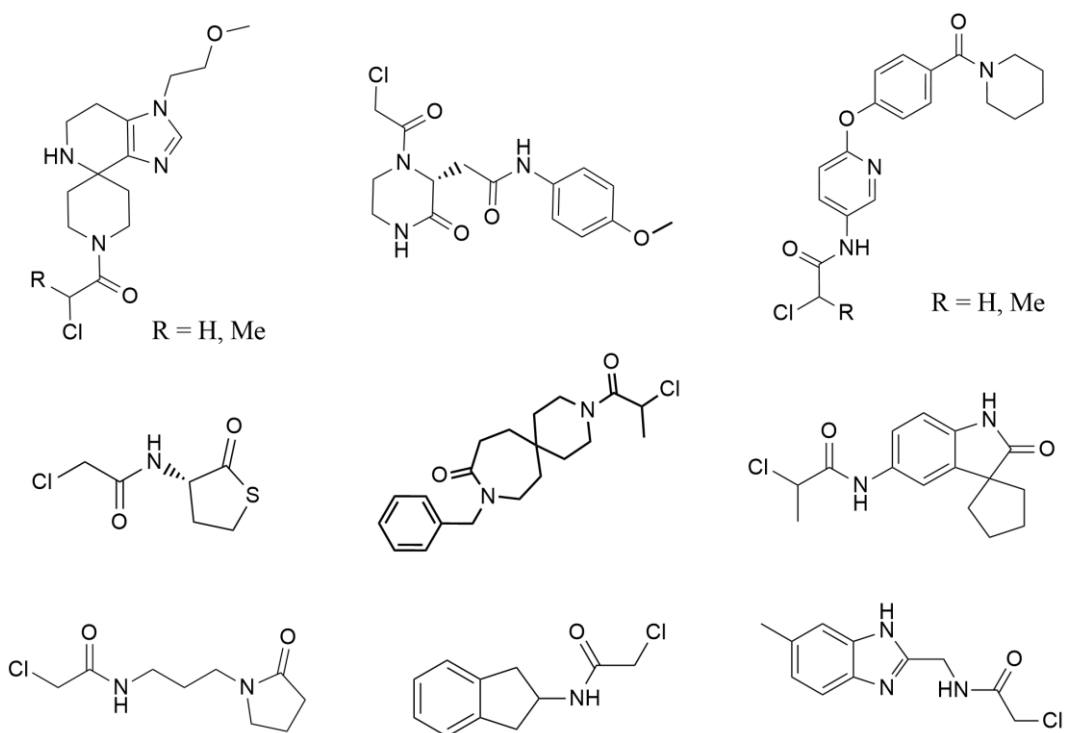


Рисунок 24 – Домашняя библиотека ковалентных лигандов

Модуль LigPrep [75] был использован для подготовки лигандов, состояния протонирования определены при $\text{pH}=7.4\pm 0.2$. Оригинальный алгоритм QikProp [76] был использован для расчета физико-химических свойств всех соединений. Графики их распределения показаны на рисунке ниже (рисунок 25).

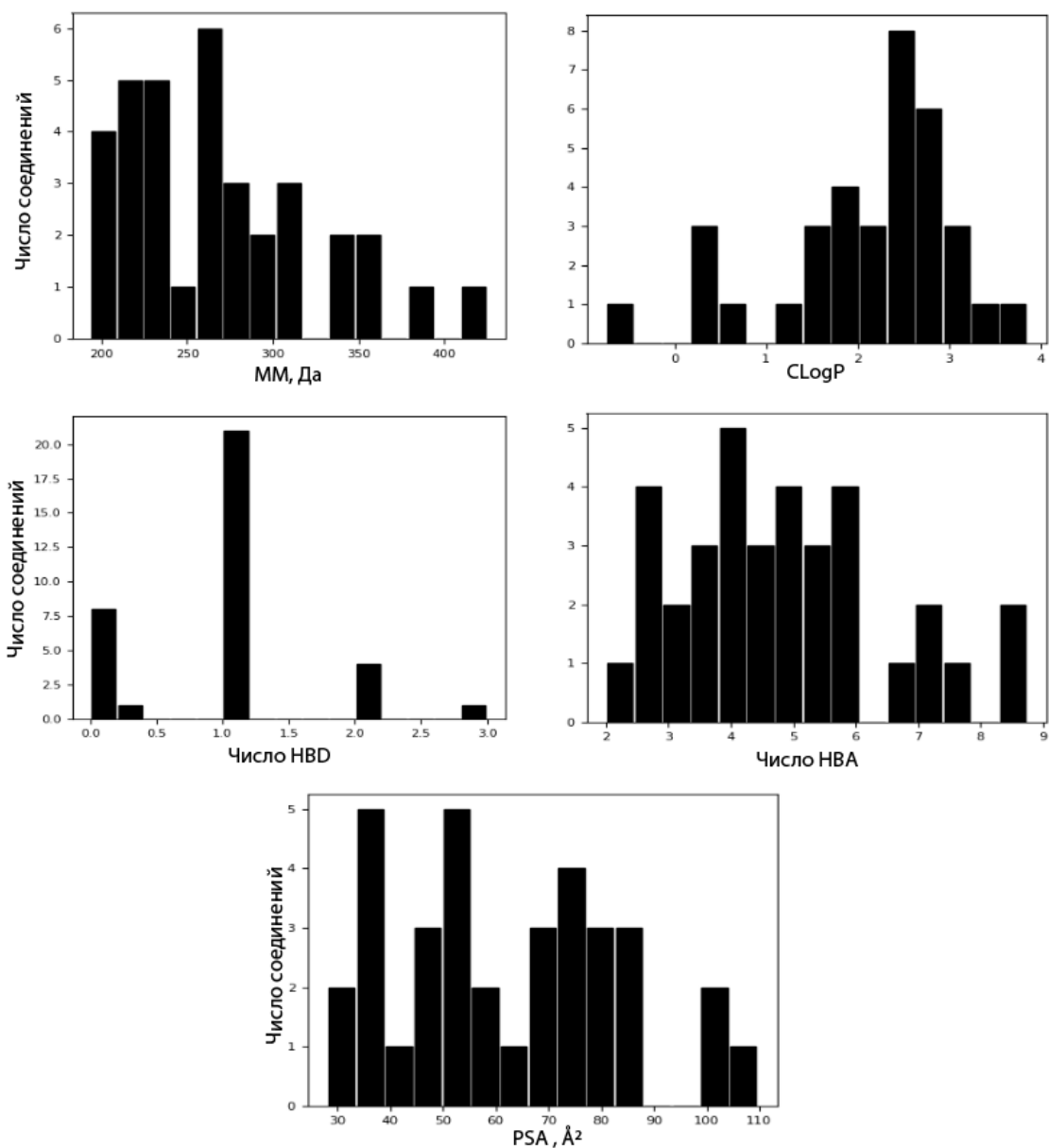


Рисунок 25 – Графики распределения физико-химических свойств

Как можно увидеть, домашняя библиотека коллекции Центра медицинской химии охватывает практически весь диапазон свойств и не содержит структуры, выходящие за пределы правила Липински.

2.2 Докинг и симуляция молекулярной динамики нативного лиганда

В качестве референсного лиганда был выбран описанный Д. Номурой и коллегами CCW-16 (41), структура которого также была подготовлена с помощью LigPrep [75]. Стыковка проводилась с использованием модуля CovalentDocking [28] в режиме Pose Prediction с дополнительным расчетом свободной энергии связывания ΔG методом ММ-GBSA [77] с помощью Prime [78], реактивным остатком был выбран Cys139. Рабочий процесс, реализуемый модулем стыковки, уже обсуждался в литературном обзоре к данной работе и не будет подробно описан здесь.

Для оценки лигандов были использованы такие параметры, как Prime Energy – полная потенциальная энергия ковалентного лиганд-белкового комплекса, ММ-GBSA ΔG_{bind} – свободная энергия нековалентного связывания, рассчитанная на основе поз, полученных Glide во время второй итерации стыковки, и CDock Affinity.

Последний параметр считается наиболее важным для анализа полученных данных, представляя собой ключевую оценку эффективности связывания, как утверждали авторы оригинальной публикации, посвященной данному алгоритму [42]. CDock Affinity представляет собой среднее значение функции оценки Glide, получаемое из до- и послереакционных поз (формула 1).

$$CdockAffinity = \frac{GlideScore_1 + GlideScore_2}{2}, \quad (1)$$

где $GlideScore_1$ и $GlideScore_2$, ккал/моль – значения оценочных функций для до- и послереакционных поз лиганда, соответственно, рассчитанные алгоритмом Glide.

Модуль стыковки обнаружил десять поз, результаты скоринга которых представлены в таблице ниже (таблица 4).

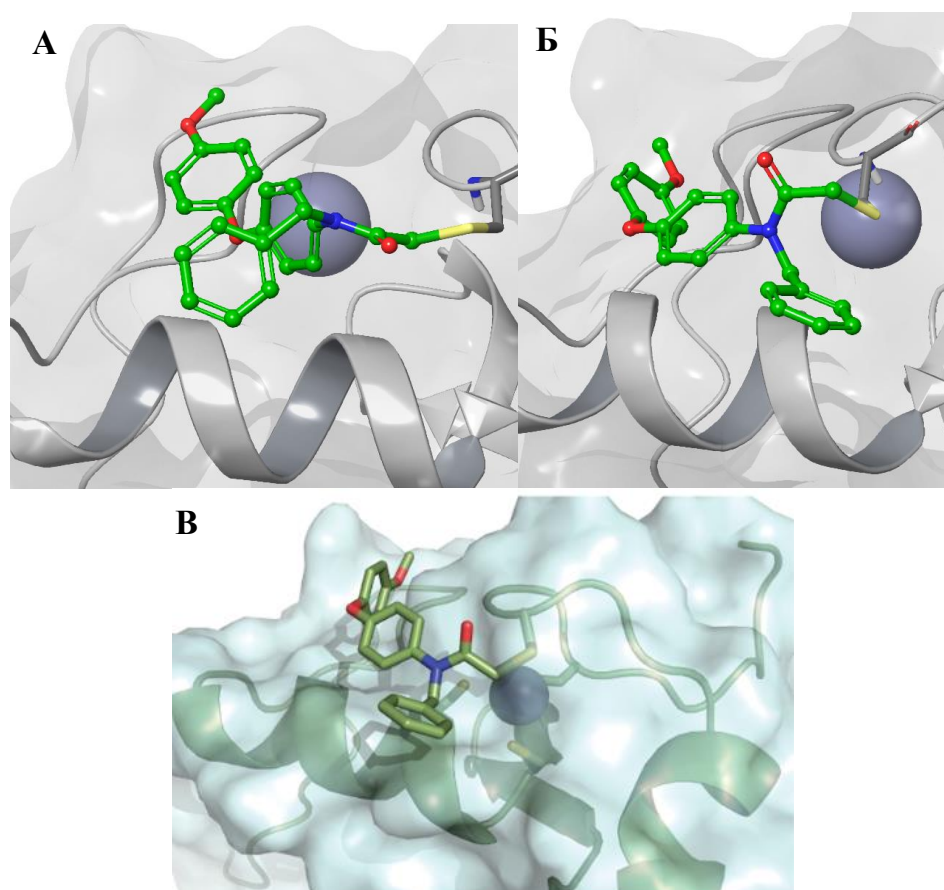
Таблица 4 – Позы нативного лиганда и значения их скоринга

Номер позы	Prime Energy, ккал/моль	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	-1839.05	-27.63	-1.919
2	-1838.58	-24.47	-1.774
3	-1837.92	-31.96	-2.096
4	-1831.69	-29.70	-2.428
5	-1828.87	-12.52	498.581
6	-1827.50	-20.71	-1.063
7	-1826.20	-24.26	-0.164
8	-1825.98	-26.87	-1.275
9	-1822.57	-21.25	-0.178
10	-1820.01	-15.59	0.407

Авторы публикации, описывающие дизайн CCW-16, также проводили ковалентный докинг для предсказания предполагаемого способа связывания лиганда. Однако результаты моделирования, к нашему сожалению, не были депонированы в виде файла координат, и для сравнения полученных нами поз пришлось ориентироваться только на рисунок из оригинальной публикации. Таким образом, позы №1 и №4 были идентифицированы как описывающие похожий способ связывания со следующими значениями скоринга: CDock Affinity = -1.919 ккал/моль и Prime Energy = -1839.1 ккал/моль и CDock Affinity = -2.428 ккал/моль и Prime Energy = -1831.7 ккал/моль, для первой и четвертой поз соответственно.

Помимо ковалентной связи, нативный CCW-16 образует множество гидрофобных взаимодействий. Позы №1 и №4 имеют некоторые различия в ориентации. Укладка дифенилэфирного фрагмента осуществляется одинаково в неглубокую гидрофобную полость близ остатка Ile138, OMe разворачивается, а бензильная группа ориентируется в область растворителя, располагаясь рядом с Arg168 и Phe162, для поз №1 и №4 соответственно. Несмотря на то, что ориентации бензильного и 4-ОМе фрагментов не

совпадают с таковыми для позы из публикации, наши результаты нельзя считать неверными – связывание происходит на поверхности белка, где лиганд подвергается действию большого числа молекул воды, что не учитывается алгоритмом CovDock, но может привести к довольно сильному изменению способа связывания. Кроме того, данные мотивы являются чрезвычайно конформационно подвижными и, вероятно, их ориентацию возможно будет оценить только с помощью молекулярно-динамической симуляции. Наконец, наши расчеты проводились на более поздней версии ПО с оптимизированными параметрами силовых полей и иных энергетических моделей, что, несомненно, также оказывает влияние на получаемую геометрию (рисунок 26).



А – связывание нативного лиганда позы №1 на поверхности RNF4, Б – укладка позы №4 CCW-16 на поверхности белка, В – связывание CCW-16 на поверхности RNF4 ([72])

Рисунок 26 – Способ связывания нативного лиганда CCW-16 на поверхности мономера RNF4

Для дополнительной оценки полученных данных нами была проведена серия симуляций молекулярной динамики для четырех поз с помощью модуля Desmond [79]. Временная эволюция системы происходила в течение 60 нс с использованием классического канонического ансамбля NPT и модели сольватации TIP3P [80].

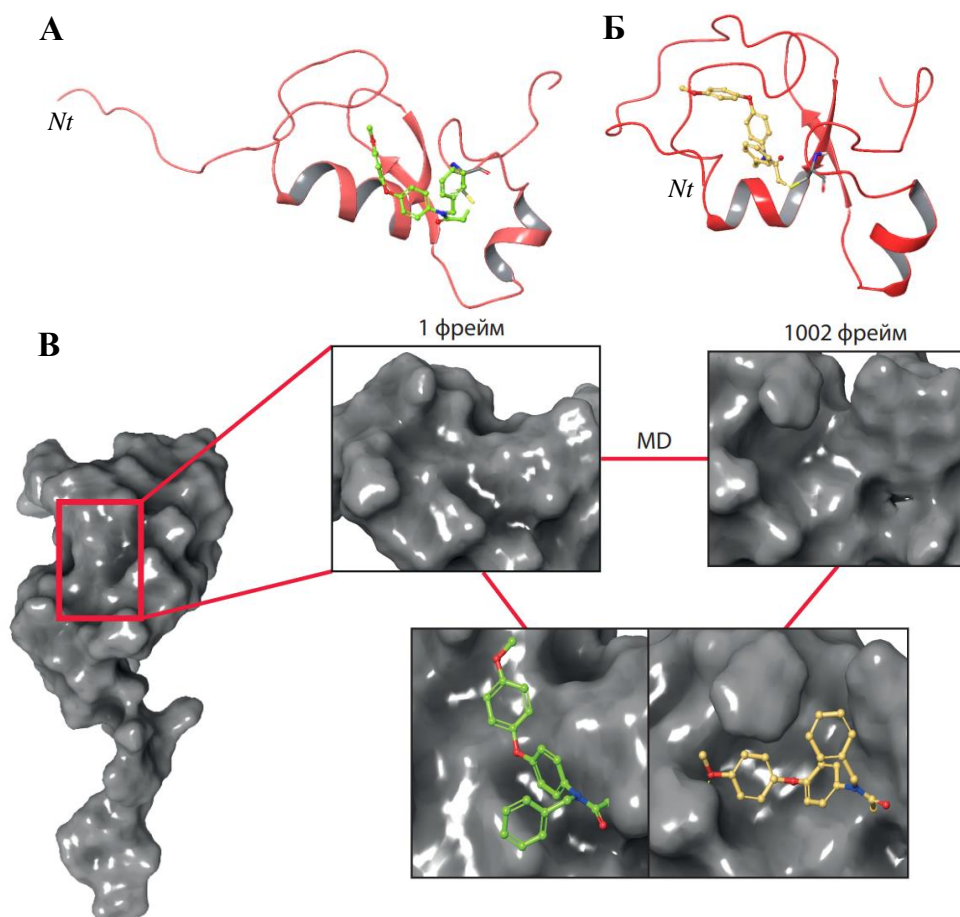
Симуляция проводилась для четырех поз: лучшей и худшей по значению Prime Energy и лучшим по значениям MM-GBSA ΔG_{bind} и CDock Affinity. На основе полученных данных было проведено сравнение стабильности комплексов белок-лиганд.

Анализ последних фреймов траектории, полученной на основе позы-лидера по значению Prime Energy, показал следующее:

- остатки, выстилающие область связывания нативного лиганда изменяют свою конформацию, образуя полость, в которую углубляется малая молекула;

- N-концевой фрагмент рецептора, являющийся чрезвычайно подвижным, скручивается, вызывая частичное раскручивание α -спирали, на поверхности которой связывается лиганд;

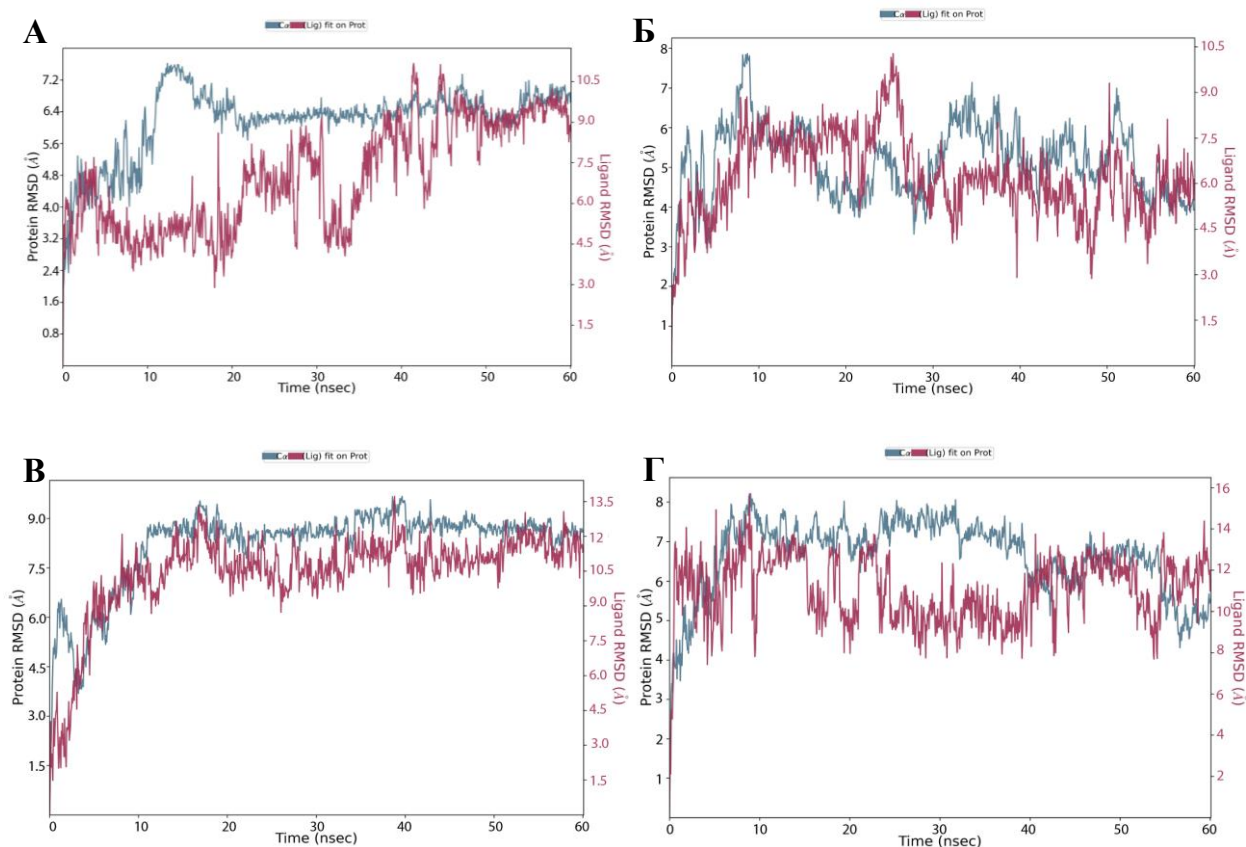
- несмотря на появление полости, в которую ориентируется лиганд, бензильный фрагмент по-прежнему не взаимодействует с белком, свободно колеблясь в области сольватации (рисунок 27).



А – комплекс до проведения MD; Б – последний фрейм молекулярно-динамической симуляции (скрученная С-цепь, уменьшенная α -спираль); В – углубление сайта связывания

Рисунок 27 – Изменения, произошедшие с белком и лигандом после проведения молекулярно-динамических симуляций

Стабильность образованных комплексов может быть оценена с помощью анализа графиков зависимости среднеквадратичного отклонения атомных координат тяжелых атомов лиганда и $C\alpha$ атомов белка от времени симуляции. К нашему сожалению, полученные результаты показывают нестабильность мономера RNF4 – колебания RMSD белка превышают допустимые 1-3 Å, а значения RMSD лиганда часто оказываются выше таковых для макромолекулы. Кроме того, не всем комплексам удалось войти в состояние равновесия (рисунок 28).



А – график для позы лучшей по CDock Affinity; Б – для позы лучше по Prime Energy; В – лучшей по MM-GBSA ΔG_{bind} ; Г – худшей по Prime Energy

Рисунок 28 – Графики зависимости RMSD от времени моделирования для четырех поз нативного лиганда мономера RNF4

Значения RMSF для атомов лиганда во всех четырех случаях наталкивают на мысль о высокой подвижности бензильного и метокси-фрагментов, что подтверждает предположения относительно их постоянного вращения в сайте связывания. Графики RMSF представлены в приложении (Приложение А), здесь же внимание можно обратить на конформационный профиль лиганда – рассчитано, что углы, соответствующие связям данных фрагментов, покрывают практически все доступное им пространство вращения (рисунок 29).

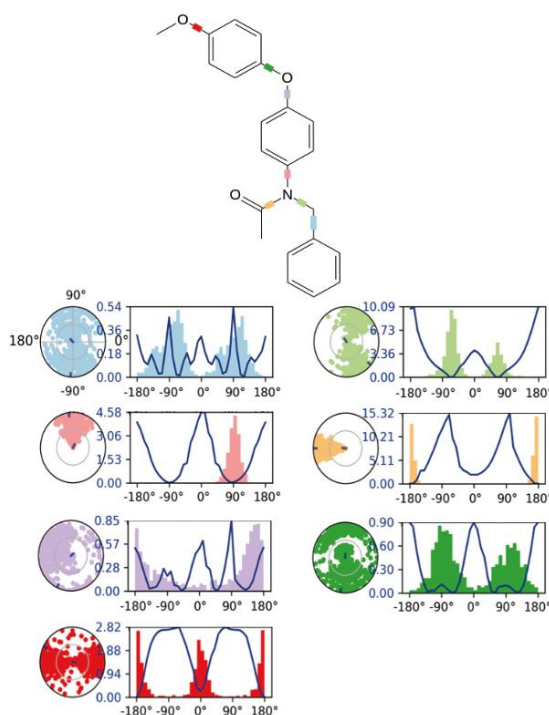


Рисунок 29 – Вращение лиганда в сайте

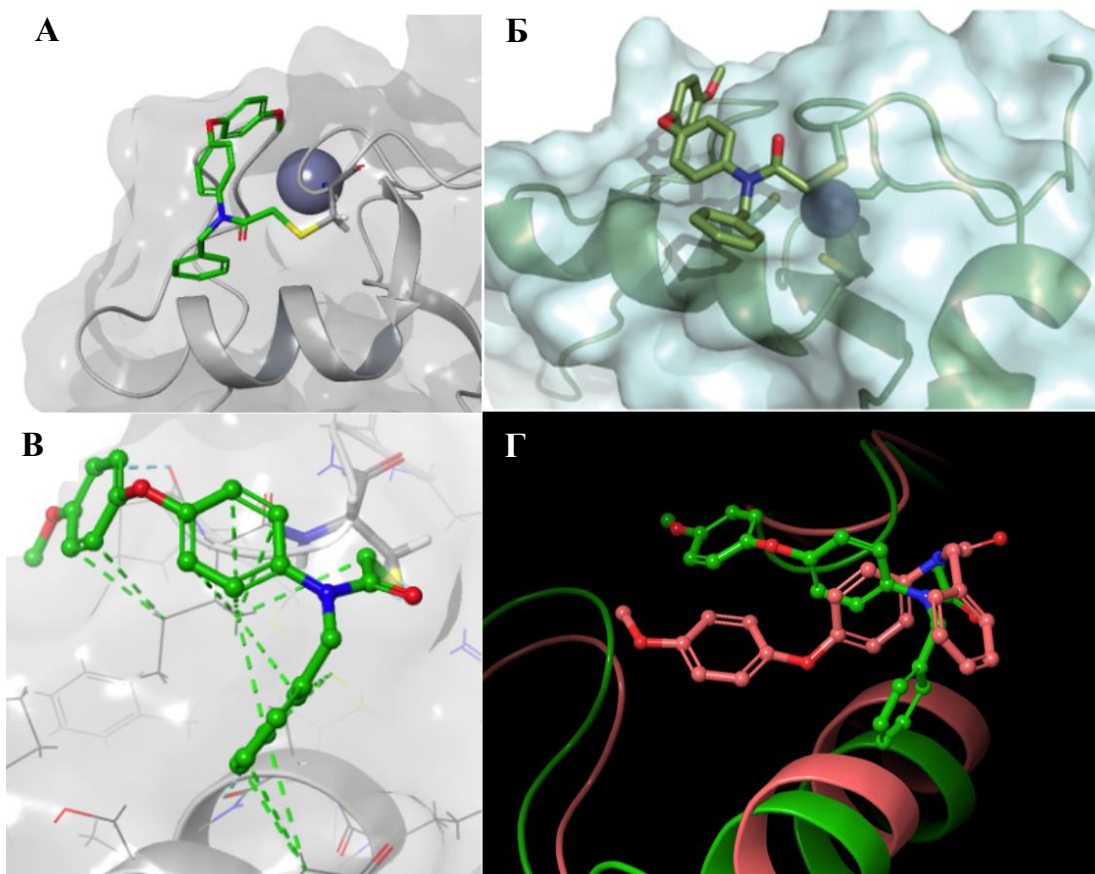
В заключение отметим, что анализ взаимодействий между белком и лигандом показал два ключевых гидрофобных взаимодействия – Cys139 и Ile138. Помимо этого, каждый из лигандов участвовал в образовании дополнительных водородных связей и взаимодействий, осуществляющихся через молекулы воды.

Полученные результаты сподвигли нас к использованию димерной структуры RNF4 для дальнейшей работы (кроме того, нельзя не отметить, что в клетках RNF4 является активным именно в виде димера).

Были повторно проведены нативный докинг и симуляция молекулярной динамики. Анализ траектории, полученной для лучшей по Prime Energy позы, показал большую стабильность димера по сравнению с мономерной формой: график зависимости RMSD от времени моделирования имел четко определенный выход на плато уже с 15 нс и позволял наблюдать существенное уменьшение значений RMSD для белка, примерно равное 6.4 Å. Подвижность бензильного и метокси- фрагментов, а также наличие двух ключевых гидрофобных взаимодействий ожидаемо сохранились и для димерной

увидеть превалирующую оккупацию только одного энергетического минимума большей частью конформеров.

Способ связывания нативного лиганда с димерной структурой RNF4 по результатам докинга представлен на рисунке ниже. Полученная поза имеет следующие значения скоринга: CDock Affinity = -1.574 ккал/моль, Prime Energy = -4313.6 ккал/моль и MM-GBSA ΔG_{bind} = -26.51 ккал/моль. Способ связывания относительно мономера изменился не сильно — лиганд, пристыкованный в димер не так глубоко укладывается в связывающую бороздку на поверхности RNF4 (рисунок 31).



А – связывание нативного лиганда на поверхности RNF4, Б – укладка CCW-16 на поверхности белка ([72]), В – гидрофобные контакты нативного лиганда, Г – наложение поз, полученных в ходе стыковки в мономерную (красный) и димерную (зеленый) структуры RNF4.

Рисунок 31 – Связывание нативного CCW-16 на поверхности димерной структуры RNF4

Таким образом, показано, что для дальнейшего моделирования

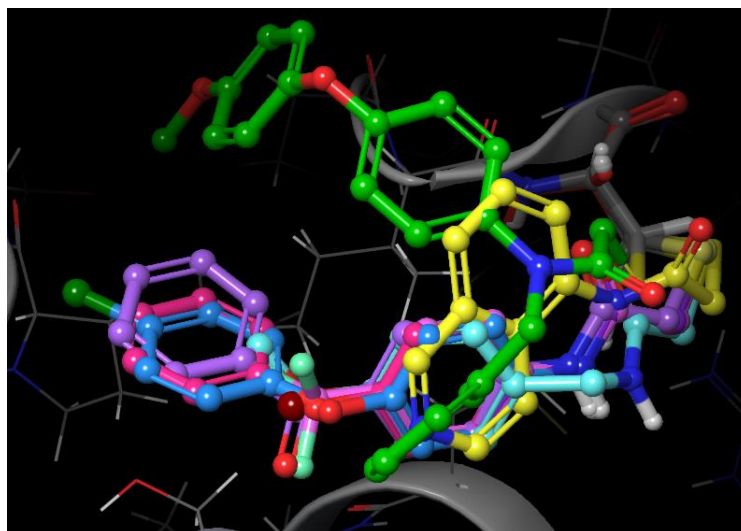
необходимо использовать именно димерную структуру.

Помимо этого, было решено провести дополнительное исследование лигандов Д. Номуры, использовавшихся в оригинальной статье для поиска хитов [72]. Так как все наши соединения представляют собой хлорацетамиды, из библиотеки авторов были отобраны лиганды с таким же мотивом. Ковалентный докинг подготовленных соединений проводился по тому же протоколу, что и для CCW-16.

Результаты показали хорошую укладку всех лигандов в сайт, но из-за особенностей строения некоторые из них были сразу определены нами, как аутсайдеры, более того они имели худшие значения CDock Affinity по сравнению с нативным лигандом. Также стоит отметить, что большая часть соединений представляет собой фрагменты, и несмотря на это они имеют лучший скоринг относительно CCW-16 (CDock Affinity = -1.574 ккал/моль, Prime Energy = -4313.6 ккал/моль и MM-GBSA ΔG_{bind} = -26.51 ккал/моль). Примерно половина превышает нативный лиганд по значениям Prime Energy и практически все лучше по CDock Affinity. Единственный параметр, по которому CCW-16 оказался лучшим – это MM-GBSA ΔG_{bind} .

На рисунке 32 представлено наложение некоторых из лигандов, которые имеют приемлемую укладку в сайте и хороший скоринг. Помимо образования ковалентной связи, соединения не дают никаких дополнительных взаимодействий, кроме гидрофобных.

Стоит отметить, что лиганды, содержащие в структуре две ароматические системы имеют приближенные к нативному значения MM-GBSA ΔG_{bind} . К тому же наличие второго кольца позволяет ориентировать соединения глубже в гидрофобную бороздку за счет образования дополнительных взаимодействий с Ile138 и Pro178.



CCW-16 (зеленый), TRH1-163 (желтый), TRH1-23 (розовый), DKM2-83 (голубой), TRH1-51 (светло-розовый), TRH1-140 (синий), DKM3-22 (фиолетовый)

Рисунок 32 – Наложение некоторых лигандов из библиотеки Д. Номуры с CCW-16 в связывающих конформациях

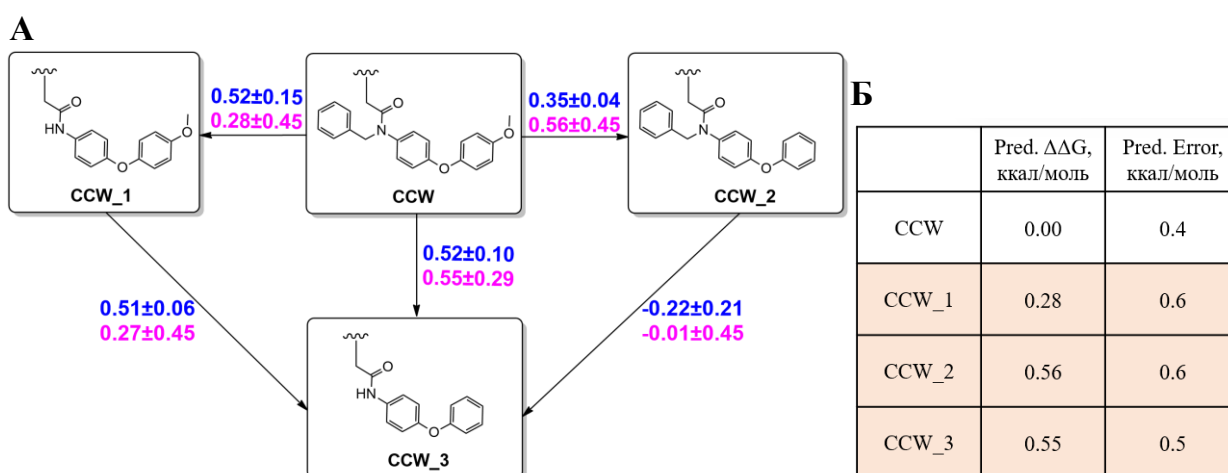
Лучшим по скорингу лигандом среди отобранных хлорацетамидов оказался TRH1-23, который, к сожалению, как указывают авторы оригинальной публикации [72], не ингибировал аутоубиквитинирование RNF4, что сподвигло коллег выбрать другое соединение в качестве отправной точки для дальнейшей оптимизации.

2.3 Оценка аффинности связывания с помощью метода возмущения свободной энергии

Для дополнительного исследования связывания нативного лиганда с RNF4 был проведен расчет относительной энергии связывания с использованием подхода возмущений свободной энергии (*англ.* FEP, Free Energy Perturbation) [81, 82]. С его помощью была оценена важность наличия бензильного мотива и метокси-группы в структуре лиганда – соединение CCW-16 подвергали итеративной деконструкции, поочередно удаляя указанные мотивы и оценивая $\Delta\Delta G_{\text{bind}}$ таких переходов.

На рисунке ниже представлена карта возмущений свободной энергии

связывания при удалении какого-либо из заместителей (рисунок 33).



Синий – энергия, рассчитанная методом BAR; Фиолетовый – энергия замыкания цикла
 А – карта возмущений; Б – обобщенные данные карты

Рисунок 33 – Данные расчета относительной энергии связывания

На карте возмущений указаны значения $\Delta\Delta G$, представляющие собой разницу в свободной энергии связывания между двумя лигандами и использующиеся для оценки относительной аффинности связывания с мишенью. Изменение свободной энергии между каждыми двумя соединениями рассчитывается по методу коэффициента приемлемости Беннетта (*англ.* BAR, Bennett acceptance ratio) [83], основанном на формуле Цванцига (формула 2):

$$\Delta\Delta G = \Delta G_A - \Delta G_B = -k_B T \ln \frac{e^{-\frac{\Delta E_B}{k_B T}}}{e^{-\frac{\Delta E_A}{k_B T}}}, \quad (2)$$

где, Т – температура, К;

k_B – постоянная Больцмана, ккал·К⁻¹;

ΔE_B и ΔE_A – изменение потенциальной энергии для данного состояния (лиганда), ккал/моль.

Второй тип значений, отмеченный фиолетовым цветом, рассчитывается по тому же методу BAR, но с учетом замыкания термодинамического цикла с

пересчетом изменения энергии по гистерезису.

Как можно увидеть, любое из описанных выше изменений в структуре приводило к увеличению энергии, что подтверждает важность этих фрагментов для аффинности связывания. Полученные результаты также согласуются с данными *in vitro* исследования, представленными в оригинальной публикации группы Номуры. Стоит отметить, что попытка провести подобное моделирование, используя структуру мономера, не увенчалась успехом – результаты были ровно противоположные (Приложение Б).

2.4 Ковалентный докинг библиотеки соединений

Ковалентный докинг подготовленных лигандов проводился по тому же протоколу, что применялся и для нативного CCW-16. Результаты стыковки для отобранных 35 соединений представлены в таблице ниже (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты ковалентного докинга библиотеки соединений

Код соединения	MM-GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль	Prime Energy, ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	2	3	4
Y020-5255	-15.73	-4354.6	-3.195
R052-1725	-17.93	-4330.4	-2.851
Y020-9951	-23.62	-4356.3	-2.817
8018-7135	-16.15	-4387.7	-2.780
T001-1017	-17.46	-4273.3	-2.663
8019-7122	-14.87	-4329.4	-2.641
6292-0250	-10.67	-4287.5	-2.598
ZE09-1182	-22.46	-4308.7	-2.576
8011-6560	-20.50	-4347.7	-2.574
T001-1322	-16.78	-4352.5	-2.531
8018-4716	-14.32	-4354.9	-2.480
T001-1392	-16.36	-4349.6	-2.461
R152-1570	-15.90	-4334.3	-2.366
ZE09-1290	-28.11	-4304.2	-2.361
T001-0952	-17.85	-4337.3	-2.340
ZE09-1936	-26.51	-4309.9	-2.310
T001-0382	-18.08	-4364.9	-2.294

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
ZE09-0733	-27.55	-4318.5	-2.264
R152-1954	-17.40	-4336.7	-2.229
T001-1599	-17.00	-4336.8	-2.184
T001-1400	-15.18	-4360.8	-2.113
T001-0450	-14.17	-4303.2	-2.066
8018-6498	-18.81	-4336.5	-2.044
V002-0745	-20.46	-4300.2	-2.009
ZE09-1286	-20.84	-4348.6	-1.987
T001-1882	-21.24	-4346.3	-1.980
ZE09-1192	-23.42	-4266.2	-1.923
4816-0003	-18.18	-4345.9	-1.828
ZE09-1535	-20.31	-4333.2	-1.811
ZE09-1329	-24.32	-4321.6	-1.777
ZE09-1379	-17.40	-4276.2	-1.731
ZE09-1274	-20.80	-4321.2	-1.663
Y020-5248	-17.19	-4328.7	-1.651
R152-0359	-3.83	-4287.6	-1.609
CCW-16	-26.31	-4313.6	-1.574
T001-1615	-19.94	-4331.4	-1.390

Структуры библиотеки соединений отображены в приложении В.

Мы старались отбирать в качестве хитов те структуры, которые удовлетворяли следующим критериям:

– сохранение схожей ориентации лигандов по сравнению с нативным CCW-16,

– наличие приемлемого выходного вектора для конъюгации линкера PROTAC,

– удовлетворительные значение скоринга (MM-GBSA ΔG_{bind} , Prime Energy, CDock Affinity лучше, чем у CCW-16).

На основе данных о связывании хлорацетамидов из нашей библиотеки и библиотеки Д. Номуры нами был определен предпочтительный хемотип для отбора потенциальных хитов, который представлен на рисунке ниже. Общий структурный мотив содержит в своем составе ацетамидный фрагмент, атом азота которого может быть включен в неароматические циклы (пиперазин), спироциклы или ароматические системы, представленные арильными или

гетероарильными кольцами, за счет которых происходит необходимое для правильной ориентации в сайте взаимодействия с Pe138 (рисунок 34).

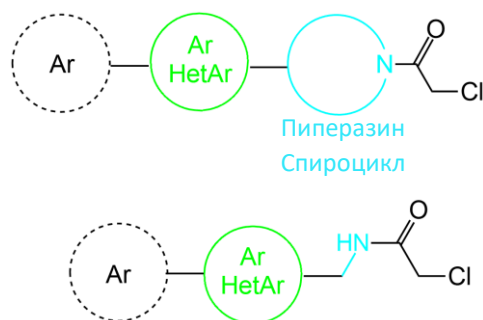


Рисунок 34 – Общий структурный мотив хитов

Соединения, не удовлетворяющие вышеприведенным критериям, были отброшены. К ним относятся: Y020-5255, 4816-0003, 8019-7122, ZE09-1329, ZE09-1274, R152-0359, 6292-0250, ZE09-1192 (рисунок 35).

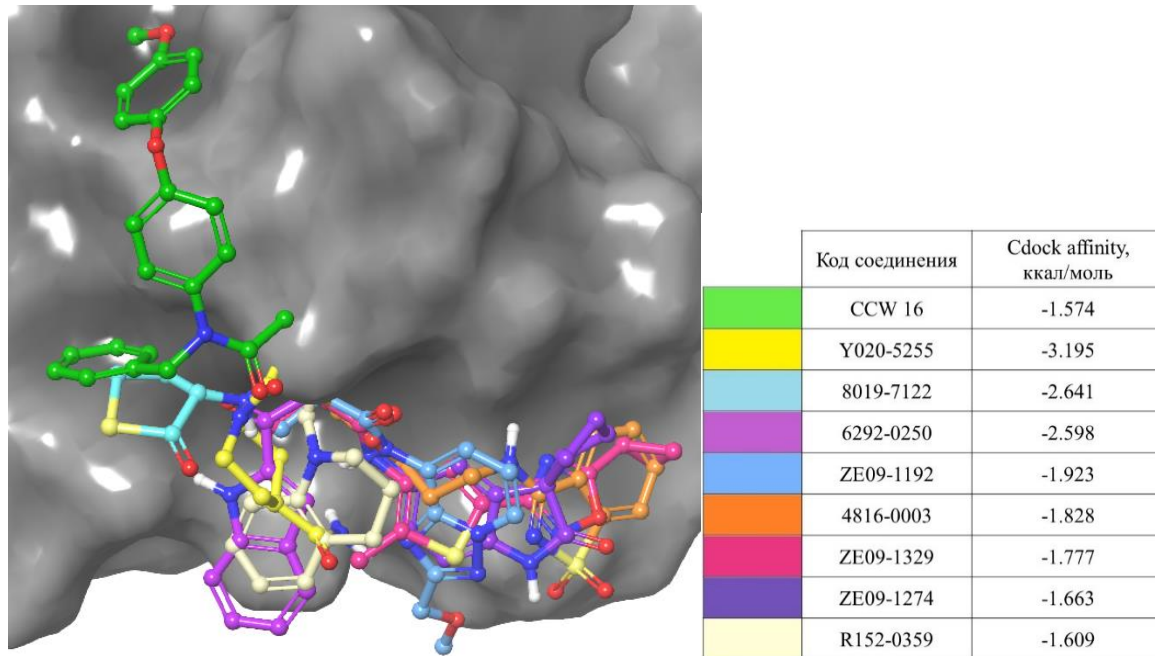
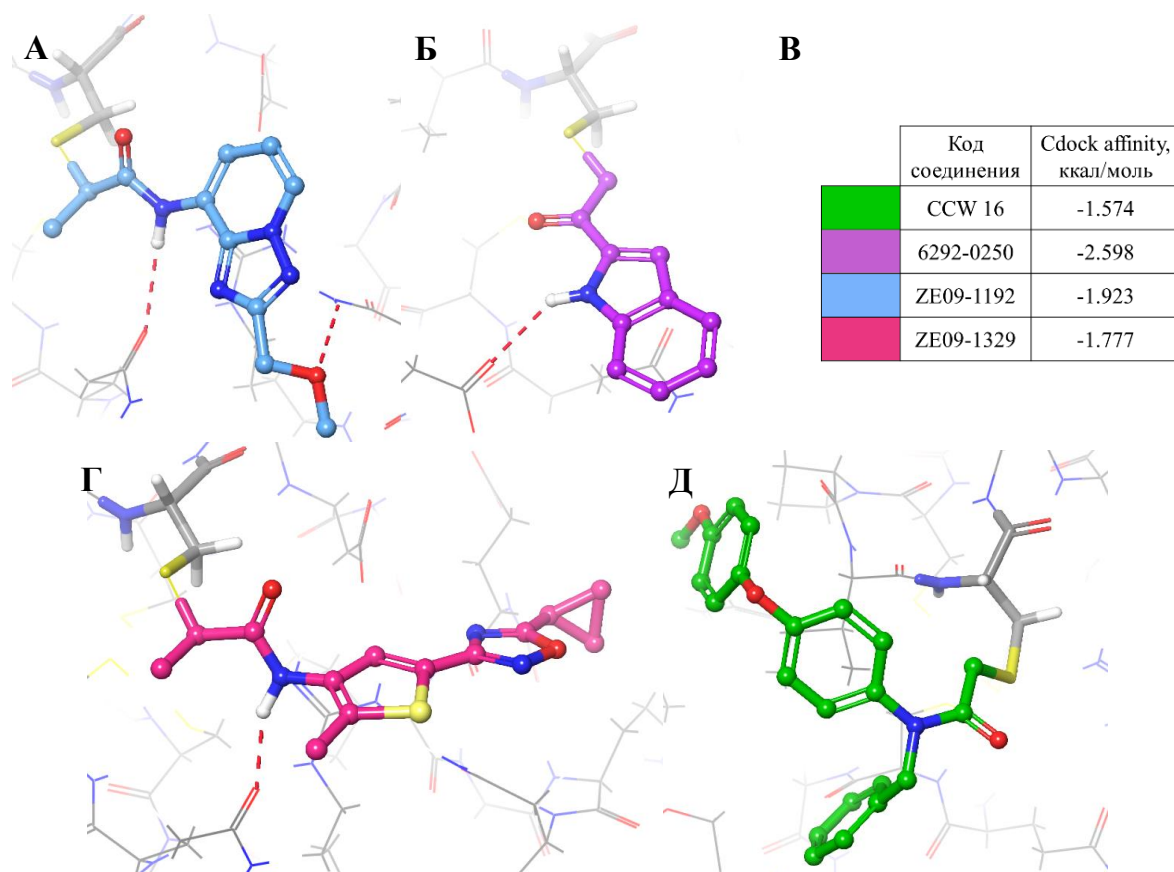


Рисунок 35 – Наложение отброшенных соединений и нативной позы CCW-16 на поверхности RNF4 со значениями скоринга

Большая часть, представленных на рисунке соединений, ориентирована

в противоположную область от нативного CCW-16. Лиганды Y020-5255, ZE09-1329, ZE09-1274 и ZE09-1192 образуют дополнительное взаимодействие с Gln165 за счет азота амидной группы, в то же время ZE09-1192 образует связь с Asn149 за счет акцептора метокси-фрагмента. Схожее взаимодействие показывает лиганд 4816-0003. Также соединения 6292-0250 и 4816-0003 принимают участие в образовании связи с Asp за счет азота индола и аминогруппы, соответственно. При этом один лиганд – 8019-7122 – занимает полость перпендикулярную CCW-16, не образуя никаких дополнительных взаимодействий.

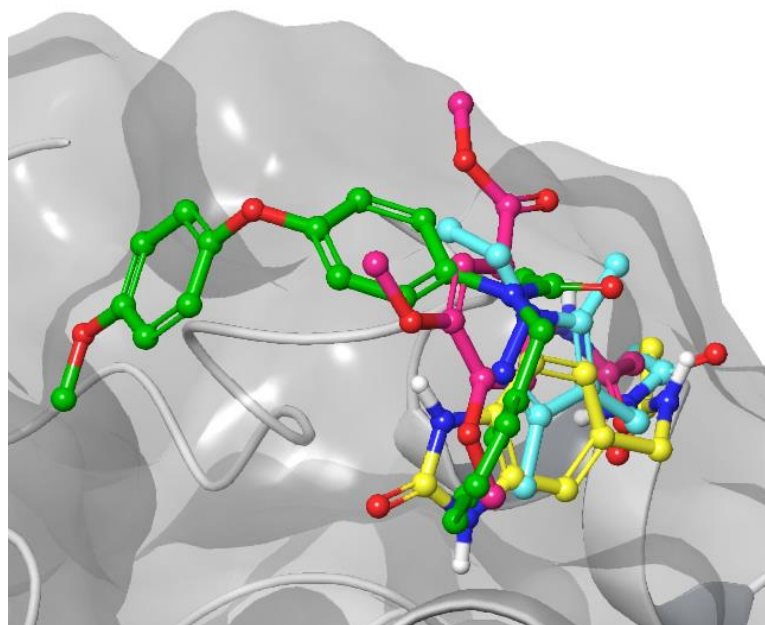
Интересно, что все отброшенные соединения обладают лучшими значениями скоринга, чем CCW-16. На рисунке 36 представлены некоторые лиганды, имеющие отличную от нативного укладку.



А – ZE09-1192; Б – 6292-0250; В – сравнительная таблица скоринга со значениями CDock Affinity; Г – ZE09-1329; Д – CCW-16

Рисунок 36 – Способы связывания соединений с укладкой на поверхности RNF4, отличающейся от нативной; красный пунктир – водородные связи

Также в домашней библиотеке коллекции Центра медицинской химии содержится большое количество фрагментов, которые могут стать потенциальными хитами, например, замещенные арилы (Y020-5248), пиразолы (T001-1392), бензимидазолы (8018-7135) и некоторые другие. Большинство из них имеют ту же направленность, что и у нативного лиганда. Однако стоит отметить, что фрагменты требуют доработки, в результате которой возможно сильное преобразование соединений с изменением их ориентаций. На рисунке ниже приведено наложение некоторых лигандов и CCW-16 (рисунок 37).



Y020-5248 (розовый), **T001-1392** (голубой), **8018-7135** (желтый), **CCW-16** (зеленый)

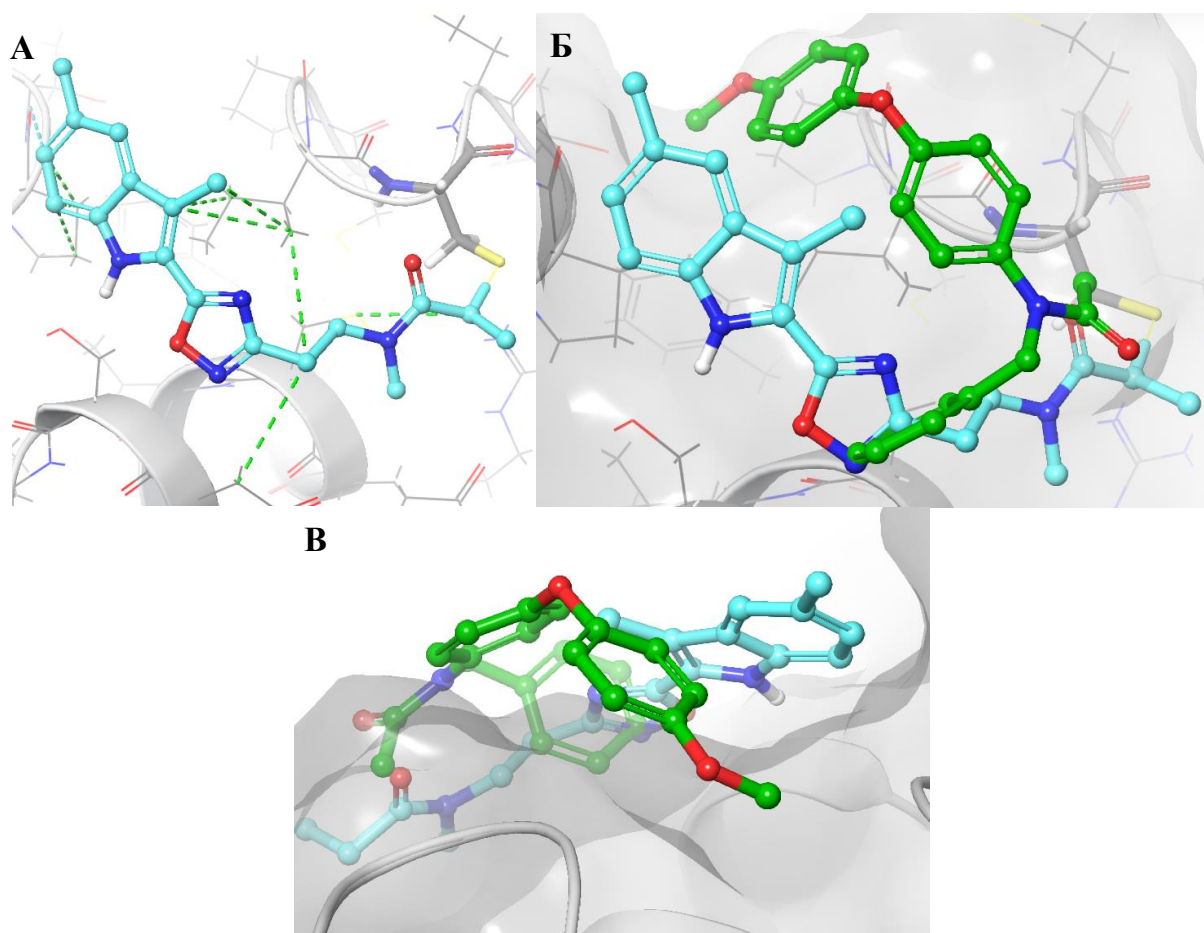
Рисунок 37 – Наложение некоторых фрагментов с нативным CCW-16

После завершения первого этапа по отсеиванию неподходящих соединений, оставшиеся лиганды были оценены. Важно отметить, что большая часть из них реализует дополнительные водородные связи и гидрофобные взаимодействия, в следствие чего обладают более высокими значениями скоринга.

Дополнительным критерием оценки стало сравнение оставшихся лигандов с соединениями из оригинальной работы Д. Номуры, имеющими хлорацетамидные группы в своем составе [72]. Их количество в библиотеке коллег не превышает 30, и большинство из них представляют собой фрагменты с арильным скаффолдом. Все лиганды с таким мотивом дали относительно плохие результаты иммуноблоттинга по сравнению с CCW-16, поэтому в нашей работе некоторые подобные соединения были отброшены. Однако, чтобы получить непредвзятые результаты, среди них были отобраны лиганды с приемлемым положением в сайте и удачным вектором выхода, которые были определены в качестве потенциальных хитов в ходе небольшого анализа.

Как говорилось выше, за координацию атома цинка в нативной структуре RNF4 отвечают четыре цистеина: Cys136, 139, 163, 166, которые после его удаления могут образовать дополнительные связи с лигандом. В нативной структуре подобные взаимодействия могут нарушить работу белка, однако в нашем случае связи не были образованы.

Первым отобранным соединением стал ZE09-1290, имеющий самое высокое значение MM-GBSA ΔG_{bind} . Лиганд простирается вдоль той же полости, образуя гидрофобные взаимодействия с Ile138 и Pro178. Однако предполагаемый вектор выхода ZE09-1290 не совпадает с направлением метила метоксигруппы (рисунок 38).



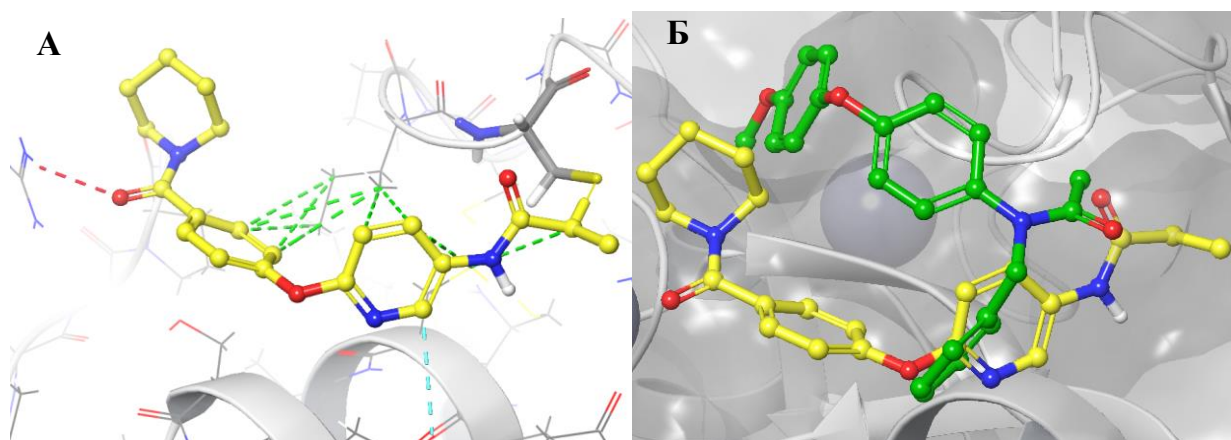
А – образование гидрофобных взаимодействий (зеленый пунктир) ZE09-1290 с RNF4; Б – наложение нативного лиганда (зеленый) с ZE09-1290 (голубой); В – различия векторов выхода

Рисунок 38 – Связывание ZE09-1290 на поверхности RNF4

Вероятной причиной различия в связывании и векторе выхода CCW-16 и ZE09-1290 является их отличающееся расположение в сайте: дифенильный фрагмент нативного лиганда ориентируется на поверхности RNF4 сверху, немного выходя в зону растворителя, тогда как ZE09-1290 укладывается точно в нее. Однако мы предполагаем, что в ходе проведения молекулярной динамики лиганды выравниваются и займут одинаковое положение в полости.

Другим отобранным кандидатом стал ZE09-0733, имеющий схожий с CCW-16 мотив двух ароматических колец, соединенных эфирной связью. К сожалению, пиперидин имеет неудачное расположение и выходит в зону растворителя. Вполне вероятно, что соединению требуется небольшая оптимизация, которая приведет к более благоприятному размещению

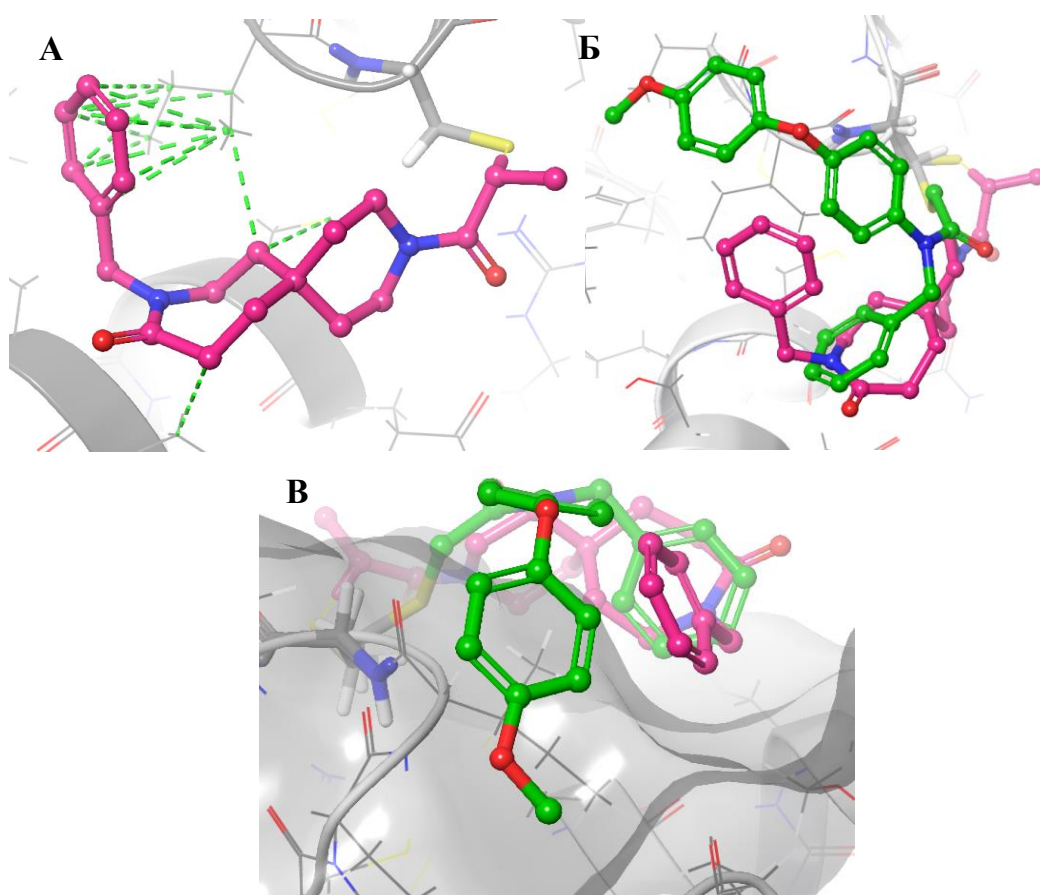
ZE09-0733 в сайте и повысит вероятность удачной конъюгации линкера (рисунок 39).



А – образование гидрофобных взаимодействий (зеленый пунктир) ZE09-0733 с RNF4, красный и голубой пунктир – водородные и ароматические водородные связи, соответственно; Б – наложение нативного лиганда (зеленый) и ZE09-0733 (желтый)

Рисунок 39 – Способ связывания ZE09-0733

ZE09-1936 стал следующим потенциальным хитом. Лиганд ранжируется как один из лучших по значению MM-GBSA $\Delta G_{bind} = -26.51$ ккал/моль. Бензильная группа образует много гидрофобных взаимодействий с Pe138, а также обеспечивает удобный вектор выхода для конъюгации линкера, который предположительно может совпасть с нативным лигандом (рисунок 40).



А – образование гидрофобных взаимодействий (зеленый пунктир) ZE09-1936 с RNF4; Б – наложение нативного лиганда (зеленый) и ZE09-1936 (розовый); В – вероятный выход вектора

Рисунок 40 – Связывание ZE09-1936 на поверхности белка

Важно отметить, что все перечисленные выше хиты имеют схожую особенность строения: в α -положении к карбонильной группе располагается метил, из-за которого лиганды немного выходят из сайта связывания в зону растворителя. Помимо ZE09-1290, ZE09-0733 и ZE09-1936 к ним также относится ZE09-1182, имеющий направление морфолинового фрагмента, совпадающее с метокси-группой нативного лиганда (рисунок 41).

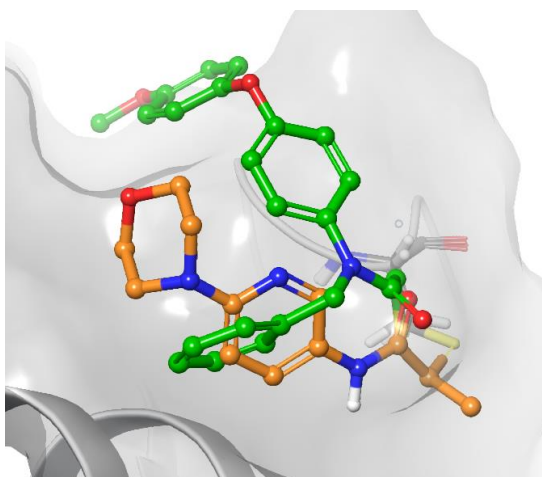
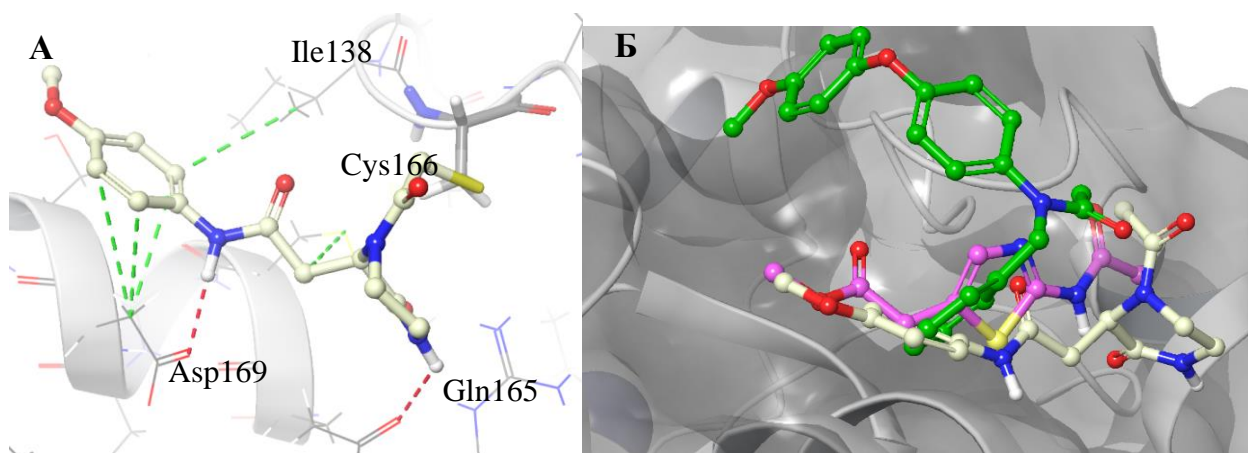


Рисунок 41 – Наложение ZE09-1182 (оранжевый) на CCW-16 (зеленый)

Следующими потенциальными рекрутерами были выделены Y020-9951 и 8018-6498. Ацилпиперазинон Y020-9951 представляет собой одно из лучших по скорингу соединений за счет образования дополнительных водородных связей с Asp169 и Gln165. Тиазолацетамид 8018-6498 не отличается созданием особых взаимодействий, принимая участия в образовании трех гидрофобных связей с Asp169, Ile138 и Cys166.

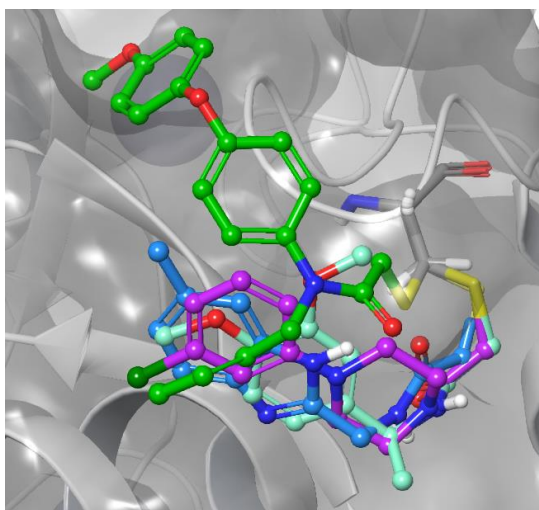
Оба лиганда сильно выходят в область растворителя, однако вероятно метокси-фрагмент и сложноэфирная группа могут принять удачное направление для конъюгации линкера PROTAC (рисунок 42).



А – образование гидрофобных взаимодействий (зеленый пунктир) и водородных связей (красный пунктир) Y020-9951 с RNF4; Б – наложение Y020-9951 (светло-желтый) и 8018-6498 (светло-розовый) на нативный лиганд (зеленый)

Рисунок 42 – Связывание Y020-9951, 8018-6498 и CCW-16

Лучшее расположение в сайте имеют фрагменты T001-1322, T001-1599 и T001-0450, занимающие центральную область и имеющие удачный вектор выхода (рисунок 43).



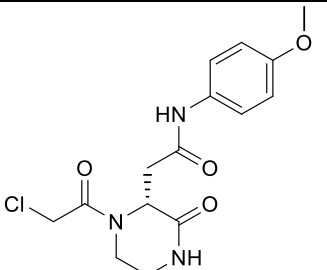
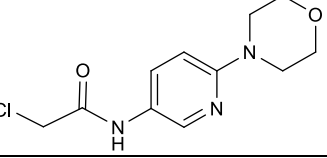
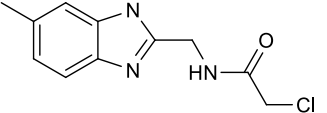
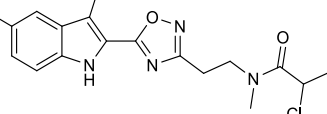
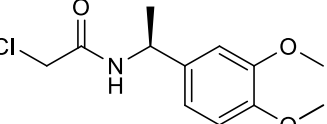
T001-1322 (светло-синий), **T001-1599** (светло-зеленый), **T001-0450** (сиреневый), **CCW-16** (зеленый)

Рисунок 43 – Наложение T001-1322, T001-1599, T001-0450 и CCW-16

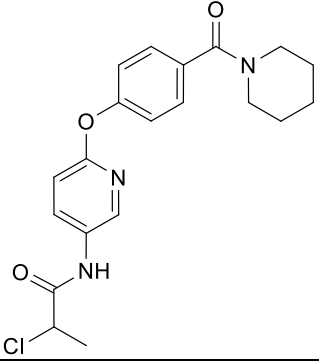
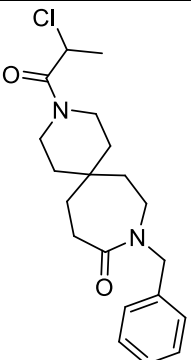
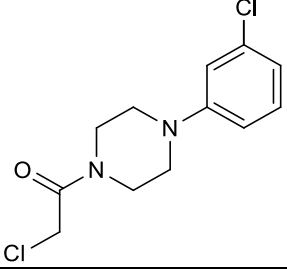
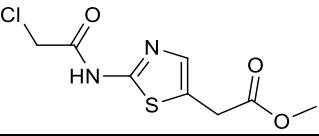
Наличие второго ароматического или гетероароматического кольца позволяет лигандам занять лучшее положение в гидрофобной бороздке. Примером таких соединений являются ZE09-1290 и ZE09-0733, которые образуют дополнительные гидрофобные взаимодействия с Pe138 и Pro178, что влияет на их удачное расположение в сайте. Подобные выводы также были сделаны ранее при оценке хлорацетамидов из библиотеки Д. Номуры.

Выбор хитов был сделан на основе критериев, перечисленных выше, а именно – высокое значение скоринга, наличие удобного выходного вектора и удачная укладка лиганда в сайте. В таблице ниже представлено 9 соединений-лидеров, отранжированных по значениям CDock Affinity (таблица 6).

Таблица 6 – Хиты, отобранные на основе проведенного ковалентного докинга

Структура	Код соединения	MM GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль	Prime Energy, ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	2	3	4	5
	Y020-9951	-23.62	-4356.3	-2.817
	ZE09-1182	-22.46	-4308.7	-2.576
	T001-1322	-16.78	-4352.5	-2.531
	ZE09-1290	-28.11	-4304.2	-2.361
	T001-1599	-17.00	-4336.8	-2.184

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5
	ZE09-0733	-27.55	-4318.5	-2.264
	ZE09-1936	-26.51	-4309.9	-2.310
	T001-0450	-14.17	-4303.2	-2.066
	8018-6498	-18.81	-4336.5	-2.044

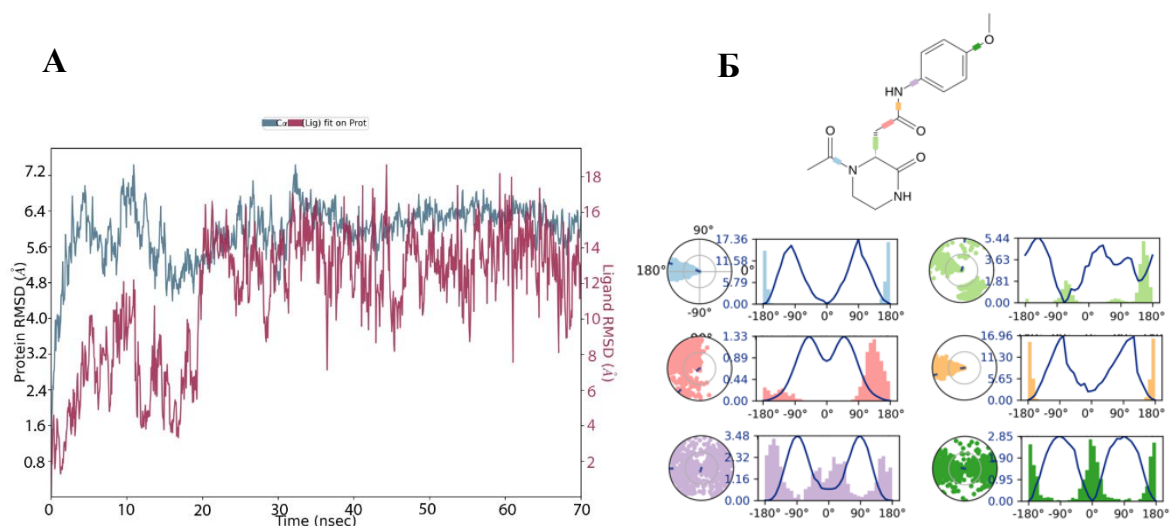
Стоит отметить, что среди хитов представлено одно соединение, имеющее высокую степень структурного подобия по отношению к нативному лиганду. И несмотря на то, что ZE09-0733 отличается способом связывания, было решено провести в будущем исследование FER+ для возможной дальнейшей оптимизации хитов и становления будущего направления развития исследований в данной области.

Для соединений, представленных в таблице, была проведена серия молекулярно-динамических симуляций для дополнительной проверки корректности полученных данных.

2.5 Симуляция молекулярной динамики отобранных хитов

Хиты, представленные в таблице выше, были дополнительно проверены с помощью модуля Desmond [80] по тому же протоколу, что использовался для нативного лиганда. Молекулярно-динамическая симуляция проводилась в течение 70 нс, после чего был выполнен анализ полученных данных.

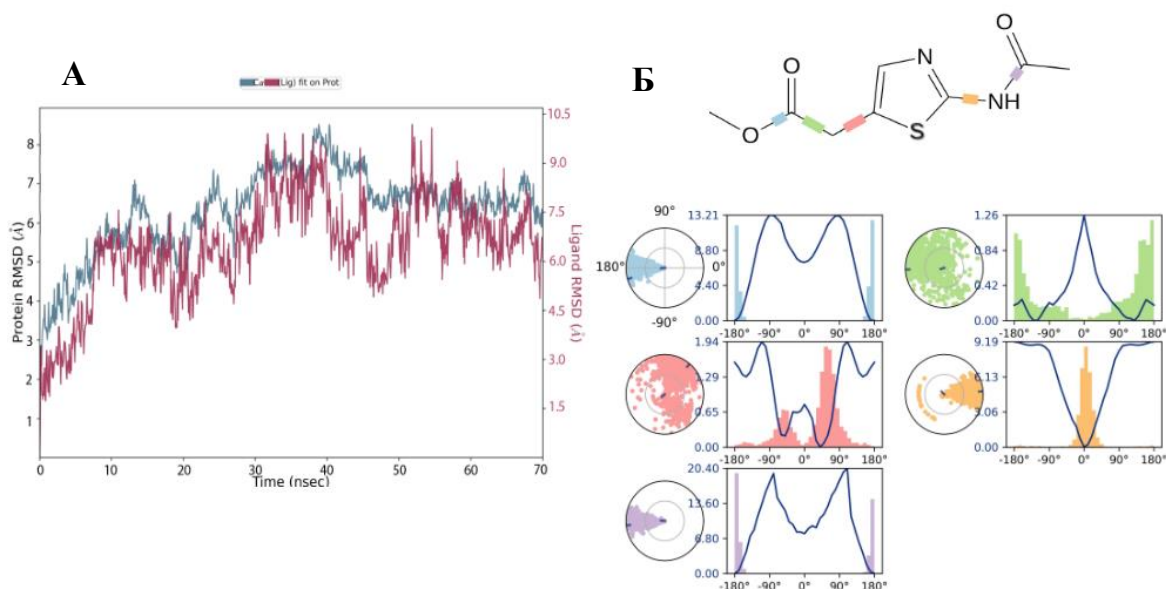
Как и предполагалось, ацилпиперазинон Y020-9951 сильно выходит за пределы сайта связывания, занимая ортогональную позицию относительно исходного положения. По графику зависимости RMSD от времени моделирования видно, что комплекс не принимает равновесное состояние, при этом значения RMSD лиганда неоднократно превышают RMSD белка. Интересно отметить, что отклонение рецептора составляет примерно 6.4 Å, что коррелирует с данными нативного комплекса, однако лиганд колеблется в пределах 10-15 Å, что несколько превышает значения для CCW-16. Конформационный профиль и значения RMSF Y020-9951 указывают на сильное вращение метокси-группы и ацетамидной связи, за счет чего предположительно и происходит полное выталкивание лиганда из сайта связывания (рисунок 44).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – конформационный профиль

Рисунок 44 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики Y020-9951

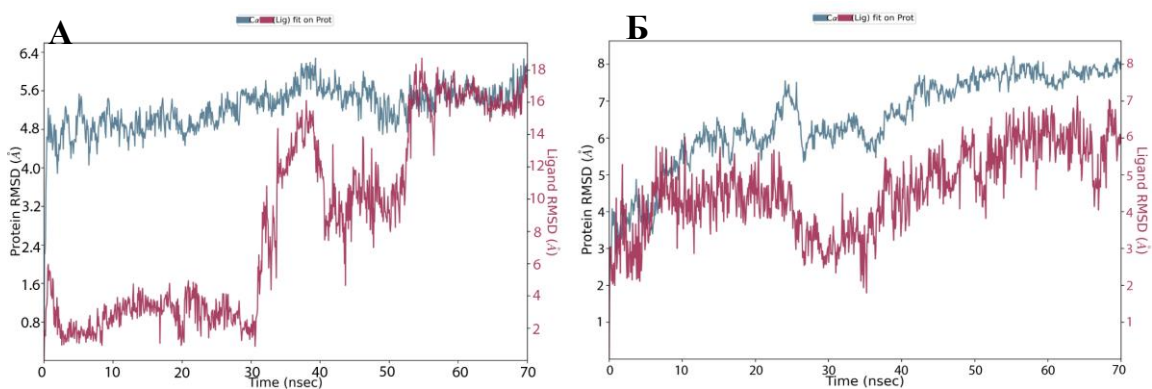
Интересно, что второе соединение – 8018-6498 – изначально выходившее за пределы сайта, имеет лучший результат эволюции системы в течение 70 нс. Лиганд ориентируется в ту же область связывания, но оборачивается на 180°, сильнее погружаясь в углубленную полость. По графику зависимости RMSD от времени моделирования видно, что колебания белка и лиганда не пришли к равновесному состоянию, из-за чего было решено отправить комплекс на дополнительную симуляцию в течение 100 нс. По результатам до вспомогательной проверки 8018-6498 имеет удовлетворительные усредненные значения RMSD для белка и лиганда, что делает его потенциальным хитом. Параметры RMSF подтверждают не сильные колебания 8018-6498 в сайте, а конформационный профиль указывает на вращение связи в пятом положении тиазольного скаффолда (рисунок 45).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – конформационный профиль

Рисунок 45 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики 8018-6498

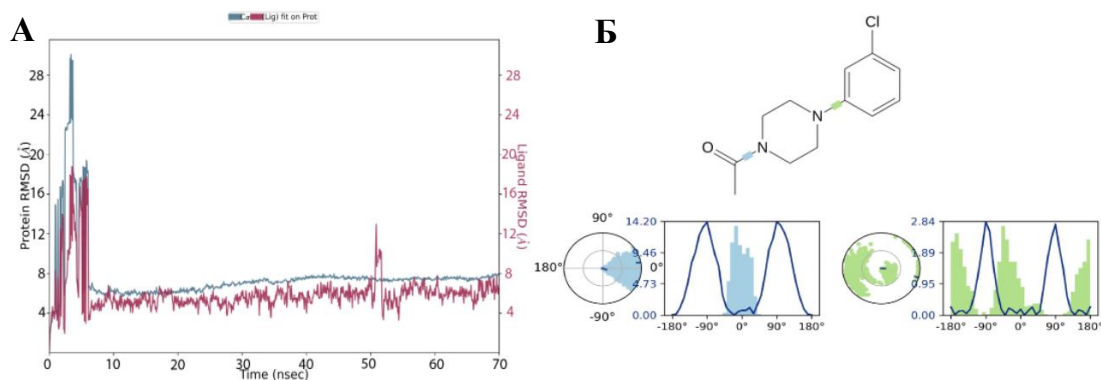
Помимо 8018-6498 на дополнительный отжиг были отправлены соединения ZE09-1936, которое является потенциальным хитом из девяти лигандов, подверженных молекулярно-динамической симуляции, и T001-1322, представляющий собой фрагмент, который в ходе 70 нс эволюции системы полностью вышел за пределы сайта связывания. По данным карты конформационного профиля и RMSF лиганда T001-1322 значительно колеблется в сайте, а ацетамидная группа подвержена сильному вращению. ZE09-1936 в свою очередь практически не изменяет положения в сайте и имеет сильно вращающийся бензильный фрагмент, благодаря которому в ходе 70 нс симуляции лиганд ориентируется в углубленную полость связывания (рисунок 46).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования для T001-1322; Б – график зависимости RMSD от времени моделирования для ZE09-1936

Рисунок 46 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики T001-1322 и ZE09-1936

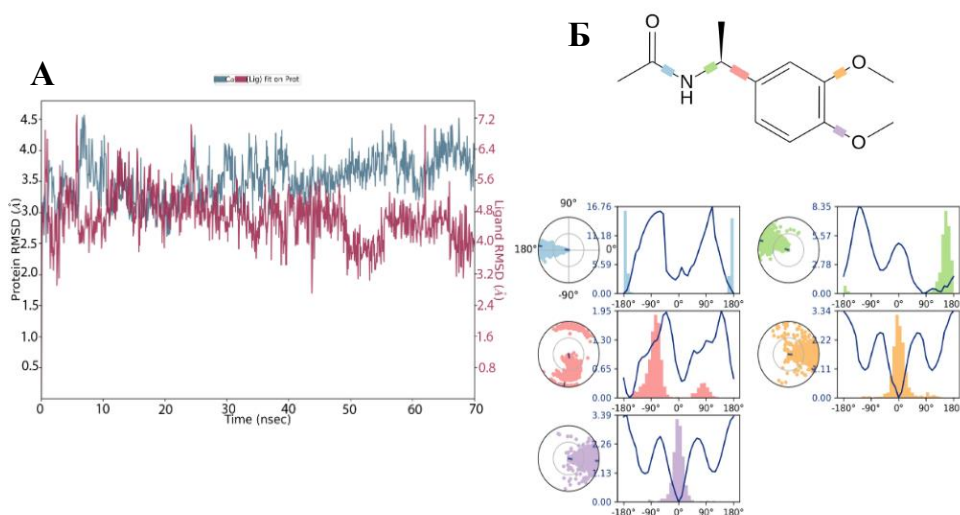
Еще два фрагмента – T001-0450 и T001-1599 – отправленные на молекулярно-динамическую симуляцию, продемонстрировали удовлетворительные результаты. T001-0450 уже на 10 нс вышел на плато, значения RMSD белка составило примерно 6-7 Å, а лиганда – 7 Å, что является неплохим результатом по сравнению с нативным CCW-16. Хлорбензольный фрагмент по данным конформационного профиля сильно вращается в полости, это подтверждается изменением ориентации лиганда – его выталкиванием на поверхность – после углубления сайта связывания (рисунок 47).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – конформационный профиль

Рисунок 47 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики T001-0450

T001-1599 остался в сайте после молекулярно-динамической симуляции, однако сместился немного вверх из-за углубления полости. Все заместители бензольного кольца были подвержены сильному вращению. По значениям RMSD T001-1599 имеет лучшие результаты, чем у нативного CCW-16. Отклонение белка составляет 4 Å, а лиганда – примерно 5 Å (рисунок 48).

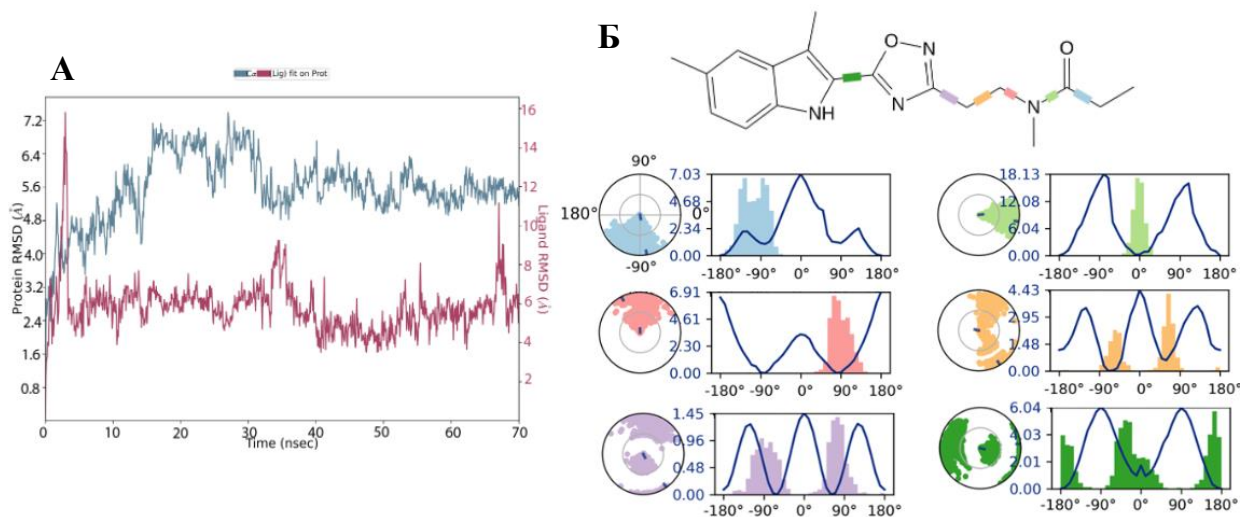


А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – конформационный профиль

Рисунок 48 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики T001-1599

Наконец хорошо показавшими себя соединениями стали – ZE09-1290, ZE09-0733 и ZE09-1182. Значения RMSD для них оказались близки к нативному лиганду или даже превосходили его, кроме того, ни одно из соединений не вышло из сайта связывания.

ZE09-1290 демонстрирует лучшие результаты, полученные в ходе молекулярно-динамической симуляции. Лиганд слегка изменяет свою ориентацию из-за углубления сайта связывания. Наибольшим колебаниям подвержена метильная группа в пятом положении относительно индольного фрагмента. Значения RMSD белка составляет 5.6 Å, а лиганда – примерно 7 Å, что подтверждает его лучшие показатели относительно нативного CCW-16, имеющего 6.4 Å и 12 Å соответственно для рецептора и лиганда (рисунок 49).

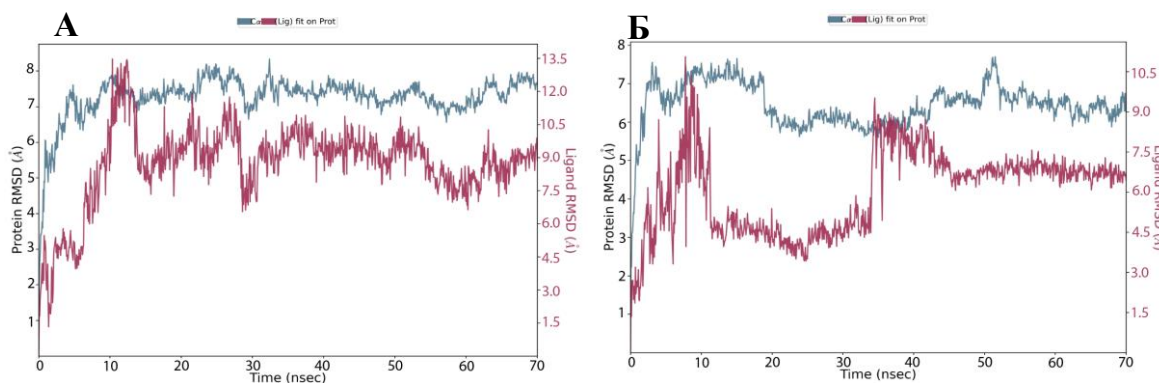


А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – конформационный профиль

Рисунок 49 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики ZE09-1290

ZE09-0733 и ZE09-1182 разворачиваются в сайте связывания из-за его углубления. ZE09-0733 опускается в полость, уходя из зоны растворителя, однако пиперидин не меняет своего положения, ориентируясь вверх. Морфолиновый фрагмент ZE09-1182 располагается перпендикулярно относительно своей изначальной позы. Отклонение белка составляет 7.5 Å и

6.5 Å, а лиганда – 9.5 Å и 7 Å для ZE09-0733 и ZE09-1182, соответственно. Наибольшему вращению подвержены связи, соединяющие арильные фрагменты как для одного, так и для другого соединения (рисунок 50).

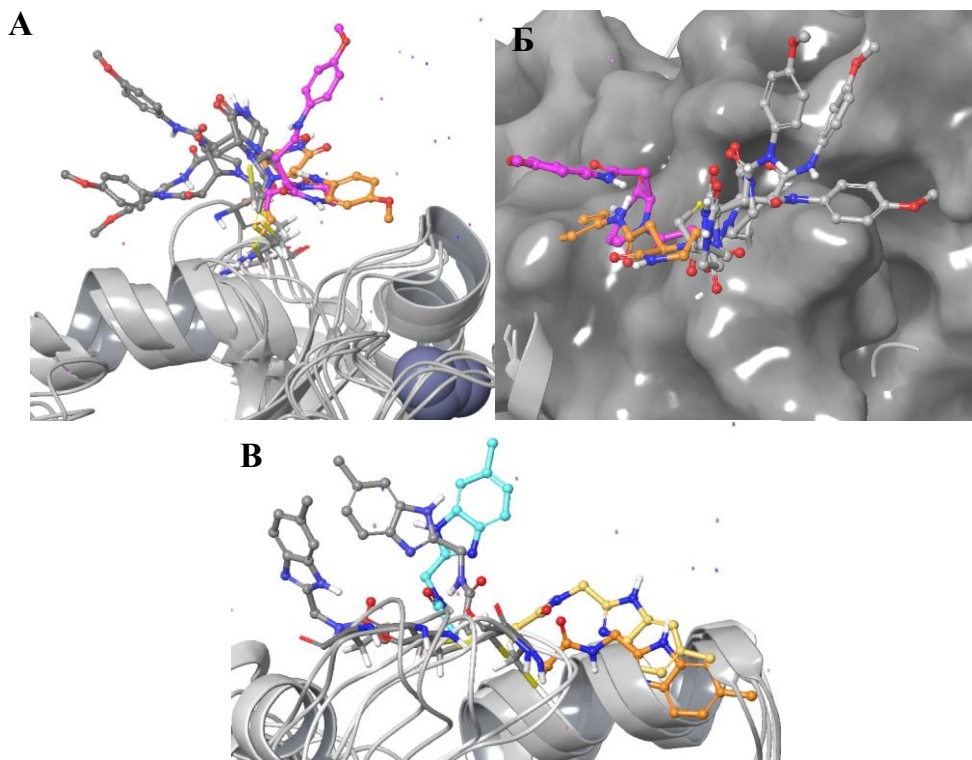


А – график зависимости RMSD от времени моделирования для ZE09-0733; Б – график зависимости RMSD от времени моделирования для ZE09-1182

Рисунок 50 – Графики, полученные в ходе симуляции молекулярной динамики ZE09-0733 и ZE09-1182

Для дополнительной проверки наших наблюдений был использован модуль Desmond Trajectory Frame Clustering. С его помощью траектория каждого комплекса, отправленного на молекулярно-динамическую симуляцию, была оценена и разделена на кластеры, каждый из которых содержал определенное количество фреймов.

На основе полученных данных был сделан вывод о расположении лигандов в ходе временной эволюции комплексов. Так, ацилпиперазинон Y020-9951 и бензимидазол T001-1322 большую часть времени симуляции ориентировались вне сайта связывания (рисунок 51), что подтверждает наши предыдущие наблюдения.

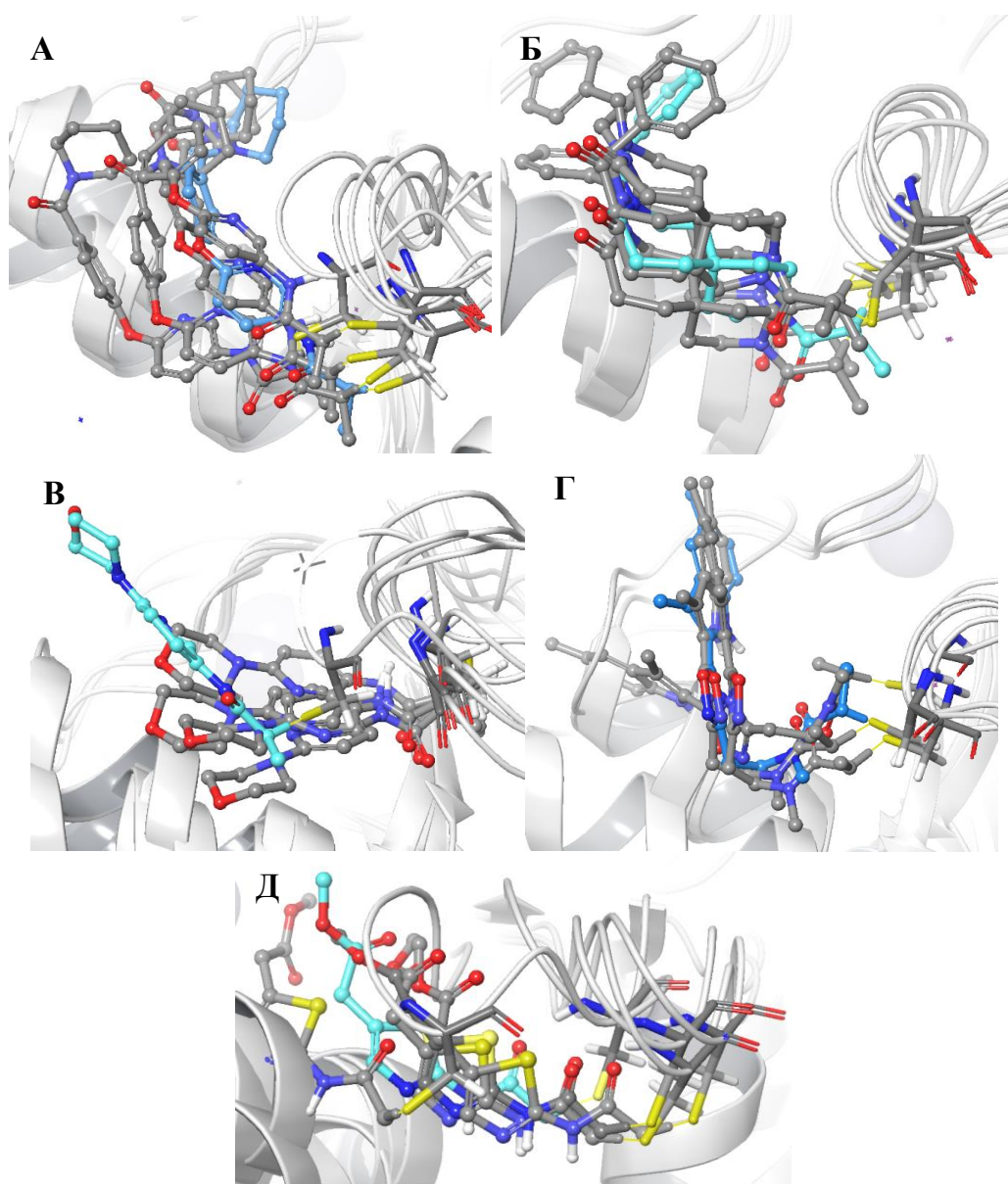


А – наложение лигандов пяти кластеров Y020-9951, розовый – ведущий, содержащий 29 фреймов, оранжевый – единственный из кластеров, располагающийся примерно в сайт связывания; Б – укладка кластеров Y020-9951 на поверхности RNF4; В – наложение лигандов пяти кластеров T001-1322, голубой – ведущий кластер, содержащий 15 фреймов, оранжевый и светло-оранжевый – кластеры, укладываемые в сайт связывания и близко к нему, соответственно

Рисунок 51 – Наложение и укладка кластеров

Однако стоит отметить, что бензимидазол T001-1322 был отправлен на дополнительную молекулярно-динамическую симуляцию, что может сыграть роль в его становлении потенциальным хитом.

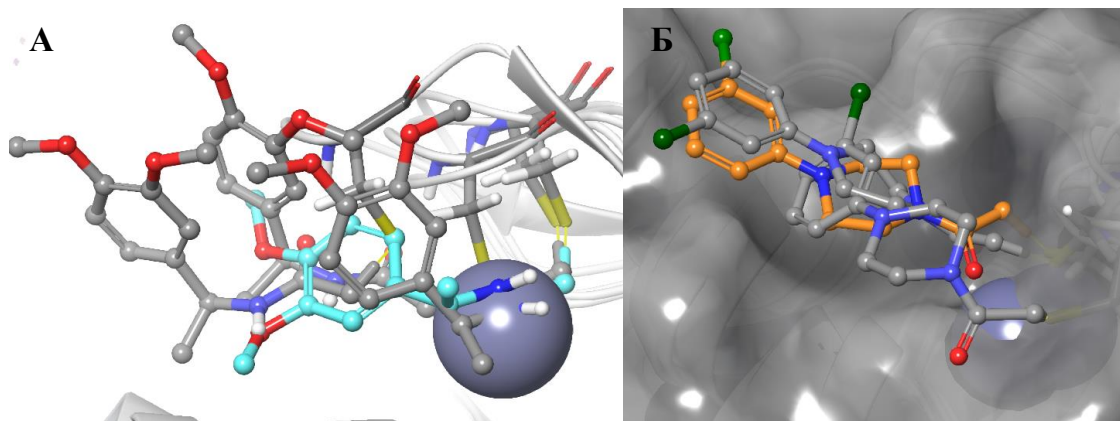
Все остальные лиганды большую часть фреймов расположены в сайте связывания или близко к нему. Наилучшее наложение кластеров имеют ZE09-0733, ZE09-1936, 8018-6498, ZE09-1182 и ZE09-1290 (рисунок 52).



А – ZE09-0733, Б – ZE09-1936, В – ZE09-1182, Г – ZE09-1290, Д – 8018-6498;
Синий и голубой – лидирующие кластеры

Рисунок 52 – Наложение лучших кластеров

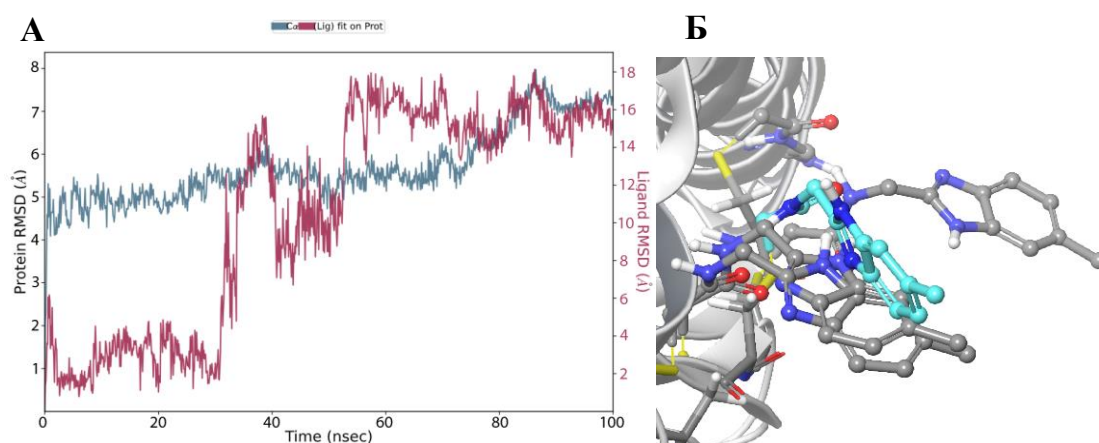
T001-1599 и T001-0450 также располагаются в сайте с небольшим выходом в зону растворителя, однако ведущий из кластеров, имеющий самое большое количество фреймов имеет хорошую укладку в сайте (рисунок 53). Это позволяет определить лиганды как потенциальные хиты.



А – T001-1599, Б – T001-0450

Рисунок 53 – Наложение кластеров для лигандов с приемлемой укладкой

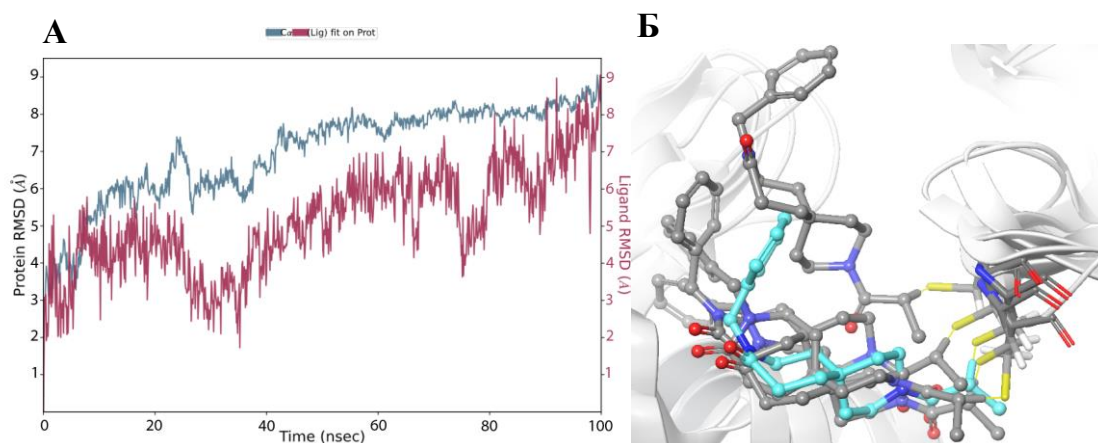
После проведения дополнительной молекулярно-динамической симуляции в течение 100 нс для соединения T001-1322 полученные данные были проанализированы. По графику зависимости RMSD видно, что комплекс выходит в равновесное состояние примерно на 90 нс, однако большую часть времени лиганд продолжает ориентироваться в область растворителя. На основе этого T001-1322 был определен в качестве аутсайдера (рисунок 54).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – наложение кластеров, голубой – ведущий кластер

Рисунок 54 – Дополнительная проверка лиганда T001-1322

К большому сожалению, лиганд ZE09-1936, выделенный нами ранее, как потенциальный хит, после проведения дополнительной молекулярно-динамической симуляции в течение 100 нс не вышел в равновесное состояние. И несмотря на то, что анализ траектории показал хорошую укладку всех кластеров в сайт связывания, соединение ZE09-1936 было выделено, как аутсайдер, которое вероятно покажет плохие результаты при его проверке в *in vitro* тестах (рисунок 55).



А – график зависимости RMSD от времени моделирования; Б – наложение кластеров, голубой – ведущий

Рисунок 55 – Дополнительная проверка лиганда ZE09-1936

Соединение 8018-6498, изначально выделенное нами как потенциальный хит, также было определено в качестве аутсайдера. В ходе проведения дополнительной молекулярно-динамической симуляции в течение 100 нс комплекс не стабилизировался (рисунок 56). Вероятно, при более длительном моделировании белок с лигандом придут к равновесному состоянию.

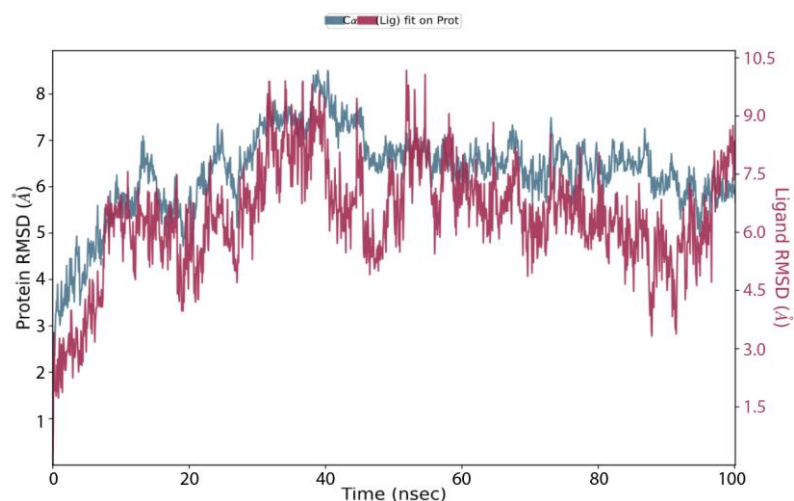


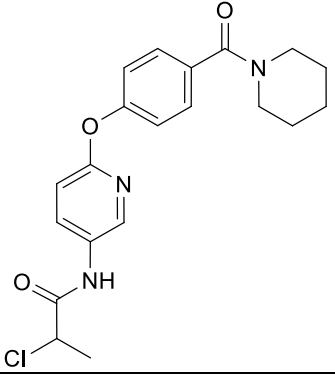
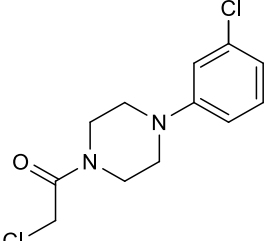
Рисунок 56 – Дополнительная проверка лиганда 8018-6498

Исходя из приведенных выше данных, было отобрано пять хитов, имеющих хорошее положение в сайте связывания и удовлетворительные значения RMSD не сильно превышающие данные нативного CCW-16. В таблице 7 представлены отобранные соединения, отранжированные по значениям CDock Affinity.

Таблица 7 – Отобранные хиты

Структура	Код соединения	MM GBSA ΔG^{bind} , ккал/моль	Prime Energy, ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	2	3	4	5
	ZE09-1182	-22.46	-4308.7	-2.576
	ZE09-1290	-28.11	-4304.2	-2.361
	T001-1599	-17.00	-4336.8	-2.184

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5
	ZE09-0733	-27.55	-4318.5	-2.264
	T001-0450	-14.17	-4303.2	-2.066

Отобранные соединения рекомендованы для дальнейших *in vitro* исследований.

3 Экспериментальная часть

3.1 Компьютерное моделирование

Подготовку структур белков и лигандов, а также ковалентный докинг проводили с применением программного пакета Schrodinger Suite 2022-4 на рабочей станции Mac Pro 2013, снабженной 10 процессорами Intel Xenon E5 (тактовая частота 3.5 ГГц) под управлением ОС Ubuntu 22.04. Симуляции молекулярной динамики и расчеты возмущения свободной энергии FEP осуществляли на рабочей станции, снабженной 64 процессорами AMD Ерус 7513 (тактовая частота 2.6 ГГц) и двумя графическими картами NVIDIA GA102GL (RTX A5000), под управлением ОС Ubuntu 22.04 с помощью все того же пакета Schrodinger.

3.1.1 Подготовка структур белка

Кристаллическая структура RNF4 (PDB ID: 4PPE) была загружена из Protein Data Bank [73]. Подготовка осуществлялась с помощью модуля ProteinPreparationWorkflow [74]. Для осуществления экспериментов с мономерной структурой цепь В была удалена.

Добавлены отсутствующие атомы водорода и боковые цепи, дисульфидные связи, уточнены порядки связей, состояние протонирования рассчитано с использованием алгоритма Epik [84] в физиологическом диапазоне $pH = 7.4 \pm 0.2$.

Атом Zn, участвующий в координации Cys136 и Cys139, молекулы воды и посторонние гетероатомы удалены. Структура RNF4 была подвергнута дополнительной минимизации с использованием силового поля OPLS4 [85].

3.1.2 Подготовка виртуальных библиотек

Структуры лигандов были подготовлены с помощью модуля LigPrep [75]; хиральность определялась так, как было указано в 2D представлении, состояние протонирования определено с использованием алгоритма Epik [84] в диапазоне $\text{pH} = 7.4 \pm 0.2$. Дополнительно проводился расчет физико-химических свойств с помощью модуля QikProp [76].

3.1.3 Ковалентный докинг

После проведения подготовки все структуры библиотеки, а также известный ковалентный рекрутер CCW-16 [72] были подвергнуты процедуре ковалентной стыковки с помощью модуля CovalentDocking [42]. В качестве реактивного аминокислотного остатка был выбран Cys139; область стыковки была определена как куб с ребром 20 Å, центр которого совпадал с положением Cys. Тип реакции был выбран как «Нуклеофильное замещение» – Cl, Br, F или I установлены в качестве реактивных атомов лиганда. Стыковка проводилась в режиме точности «Pose Prediction» с дополнительной оценкой свободной энергии связывания методом MM-GBSA [77]. Остальные настройки модуля стыковки были установлены по умолчанию и не изменялись.

3.1.4 Симуляция молекулярной динамики

Молекулярно-динамические симуляции проводились с помощью модуля Desmond [79]. Все исследуемые системы были нейтрализованы добавлением необходимого количества ионов Cl⁻ или Na⁺, дополнительной релаксации комплексов не проводилось. TIP3P [80] была выбрана в качестве модели растворителя, NPT – в качестве канонического ансамбля, а сама симуляция проводилась в течение 60-100 нс с шагом интегрирования в две фс при T=300 К и P=1 атм. Остальные настройки были оставлены по умолчанию и не изменялись. Полученные траектории по завершении расчетов анализировались с помощью модулей Simulation Interaction Diagram и Desmond Trajectory Clustering.

3.1.5 Расчеты FEP

Расчеты относительной энергии связывания проводились с использованием метода возмущения свободной энергии (*англ.* Free Energy Perturbation), реализованного в модуле FEP+ [81, 82]. Лиганд CCW-16 был подвергнут модификации с поочередным удалением OMe-группы и OВn-фрагмента с помощью модуля 3D Builder.

Для расчета использовался стандартный протокол Desmond [79] NPT в двух средах: «В комплексе» и «В чистом растворителе». В качестве модели сольватации применялась SPC, буферное расстояние для комплекса было равно 5 Å, а для чистого растворителя – 10 Å. Для каждого возмущения использовалось 12 лямбда-окон, время моделирования для каждого лямбда-окна составляло 0.6 нс. Моделирование проводилось при температуре 300 К. Результаты анализировались с помощью метода коэффициента приемлемости Беннетта [83].

Заключение

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

– впервые показано, что для повышения точности моделирования стыковки важно использовать именно димерную структуру белка RNF4. Это было подтверждено с помощью молекулярно-динамической симуляции, которая показала большую стабильность образованного комплекса (CDock Affinity = -1.574 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{bind} = -26.51 ккал/моль, Prime Energy = -4313.6 ккал/моль) и меньшую подвижность лиганда в сайте по сравнению с мономером (CDock Affinity = -1.919 ккал/моль, MM-GBSA ΔG_{bind} = -27.63 ккал/моль, Prime Energy = -1839.1 ккал/моль). Кроме того, именно димер является биологически активным в организме;

– впервые применен метод возмущения свободной энергии (FEP) для анализа ковалентного связывания нативного лиганда CCW-16 с Cullin-RING RNF4, показана важность бензильного и 4-метоксифенильного фрагментов для обеспечения аффинности связывания с лигазой;

– проведен виртуальный скрининг коллекции ковалентно-реактивных лигандов Центра медицинской химии, в ходе чего идентифицировано пять соединений-хитов: производные пиридина (ZE09-1182 и ZE09-0733), пиперазина (T001-0450), оксадиазола (ZE09-1290) и соединение, содержащее 3,4-диметоксифенильный фрагмент (T001-1599) – рекомендованных для *in vitro* исследования. Установлено, что наиболее высокую аффинность связывания имеют структуры, включающие ацетамидный атом азота в алифатические (пиперазин) системы, а также имеющие ароматические или гетероароматические мотивы (индол, тиофен, тиазол), способные образовывать гидрофобные взаимодействия с Pe138. Также выяснено, что наличие второго ароматического кольца позволяет занять лиганду лучшее положение в гидрофобной бороздке за счет дополнительных взаимодействий с Pe138 и Pro178, что также было подтверждено при проверке библиотеки Д. Номуры из оригинальной статьи. Проведено молекулярно-динамическое

исследование соединений-хитов – во всех случаях наблюдаются стабильные комплексы на протяжении практически всего времени симуляции со средним значением RMSD по белку 6.02 Å, а по лиганду – 6.68 Å, что является лучшим результатом по сравнению с нативным CCW-16 (RMSD по белку составляет 6.4 Å, по лиганду – 11 Å), способ связывания соединений значительно не изменяется.

Исходя из вышесказанного, важно отметить, что в целом работа подтверждает потенциал RNF4 как перспективной мишени для разработки ковалентных рекрутеров в контексте дальнейшего дизайна новых молекул PROTAC. Выявленные нами хиты расширяют химическое пространство лигандов RNF4, демонстрируют достаточную активность по результатам *in silico* расчетов.

Список используемой литературы

1. Noe M. C. Targeted covalent enzyme inhibitors / M. C. Noe, A. M. Gilbert // *Annu. Rep. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 47. – P. 413-439.
2. Singh J. The resurgence of covalent drugs / J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie et. al. // *Nat. Rev. Drug Discovery.* – 2011. – Vol. 10, № 4. – P. 307-317.
3. Recent advances in selective and irreversible covalent ligand development and validation / T. Zhang, J. M. Hatcher, M. Teng et. al. // *Cell Chem. Biol.* – 2019. – Vol. 26, № 11. – P. 1486-1500.
4. CovalentInDB: a comprehensive database facilitating the discovery of covalent inhibitors / H. Du, J. Gao, G. Weng et. al. // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49, № D1. – P. D1122-D1129.
5. Sutanto F. Covalent inhibitors: a rational approach to drug discovery / F. Sutanto, M. Konstantinidou, A. Dömling // *RSC Med. Chem.* – 2020. – Vol. 11, № 8. – P. 876-884.
6. CovalentInDB. URL: <http://cadd.zju.edu.cn/cidb/> (дата обращения 25.02.2024)
7. Baker B. R. Factors in the design of active-site-directed irreversible inhibitors / B. R. Baker // *J. Pharm. Sci.* – 1964. – Vol. 53, № 4. – P. 347-364.
8. Sneader W. The discovery of aspirin: a reappraisal / W. Sneader // *Bmj.* – 2000. – Vol. 321, № 7276. – P. 1591-1594.
9. Further observations on penicillin / E. P. Abraham, E. Chain, C. M. Fletcher et al. // *The Lancet.* – 1941. – Vol. 238, № 6155. – P. 177-189.
10. Omeprazole use at an urban county teaching hospital / D. J. Brandhagen, A. M. Pheley, G.R. Onstad et al. // *J. Gen. Int. Med.* – 1995. – Vol. 10. – P. 513-515
11. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel / P. Savi, J. M. Pereillo, M. F. Uzabiaga et al. // *Thrombosis and haemostasis.* – 2000. – Vol. 84, № 11. – P. 891-896.
12. Panischeva L. A. The influence of proteasome inhibitor bortezomib on

ABC transporters' expression and activity in tumor cells / L. A. Panischeva, E. S. Kakpakova, E. Y. Rybalkina et al. // *Biochem. (Mosc.) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 4. – P. 220-225.

13. Rotella D. P. The discovery and development of boceprevir / D. P. Rotella // *Exp. Opin. Drug Discovery.* – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. 1439-1447.

14. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy / L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. Sirisawad et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 107, № 29. – P. 13075-13080.

15. Osimertinib for pretreated EGFR Thr790Met-positive advanced non-small-cell lung cancer (AURA2): a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study / G. Goss, C.-M. Tsai, F. A. Shepherd et al. // *Lanc. Oncol.* – 2016. – Vol. 17, № 12. – P. 1643-1652.

16. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 / D. R. Owen, C. M. N. Allerton, A. S. Anderson et al. // *Science.* – 2021. – Vol. 374, № 6575. – P. 1586-1593.

17. Sotorasib for lung cancers with KRAS p. G12C mutation / F. Skoulidis, B. T. Li, G. K. Dy et al. // *New England Journal of Medicine.* – 2021. – Vol. 384, № 25. – P. 2371-2381.

18. Tuley A. The taxonomy of covalent inhibitors / A. Tuley, W. Fast // *Biochem.* – 2018. – Vol. 57, № 24. – P. 3326-3337.

19. Strelow J. M. A perspective on the kinetics of covalent and irreversible inhibition / J. M. Strelow // *SLAS Discovery: Adv. Life Sci. R&D.* – 2017. – Vol. 22, № 1. – P. 3-20.

20. Kiely-Collins H. The role of reversible and irreversible covalent chemistry in targeted protein degradation / H. Kiely-Collins, G. E. Winter, G. J. L. Bernardes // *Cell Chem. Bio.* – 2021. – Vol. 28, № 7. – P. 952-968.

21. Mechanism-based inhibition: deriving KI and kinact directly from time-dependent IC50 values / B. F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau et al. // *SLAS Discovery.* – 2009. – Vol. 14, № 8. – P. 913-923.

22. Schaefer D. Recent advances in covalent drug discovery / D. Schaefer, X. Cheng // *Pharm.* – 2023. – Vol. 16, № 5. – P. 663.1-33.
23. Nouvelle perspective de traitement dans le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC). Place de l'afatinib: Un inhibiteur oral et irréversible de la famille ErbB / M. Wislez, D. Malka, J. Bennouna et al. // *Bulletin du cancer.* – 2014. – Vol. 101, № 6. – P. 647-652.
24. Grabe T. C797S resistance: the undruggable EGFR mutation in non-small cell lung cancer? / T. Grabe, J. Lategahn, D. Rauh // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2018. – Vol. 9, № 8. – P. 779-782.
25. Mechanism of covalent binding of ibrutinib to Bruton's tyrosine kinase revealed by QM/MM calculations / A. Voice, J. Tresadern, R. Twidate et al. // *Chem. Sci.* – 2021. – Vol. 12, № 15. – P. 5511-5516.
26. Huang F. Covalent warheads targeting cysteine residue: The promising approach in drug development / F. Huang, X. Han, X. Xiao et al. // *Mol.* – 2022. – Vol. 27, № 22. – P. 7728.1-18.
27. Gehringer M. Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors: applications in medicinal chemistry and chemical biology / M. Gehringer, S. A. Laufer. // *J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 62, № 12. – P. 5673-5724.
28. Covalent Docking Schrödinger Software Release 2015-2: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – 30 p.
29. Rapid covalent-probe discovery by electrophile-fragment screening / E. Resnick, A. Bradley, J. Gan et al. // *JACS.* – 2019. – Vol. 141, № 22. – P. 8951-8968.
30. Liu Y. Activity-based protein profiling: the serine hydrolases / Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1999. – Vol. 96, № 26. – P. 14694-14699.
31. Greenbaum D. Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools / D. Greenbaum, K. Medzihradsky, M. Bogyo et al. // *Chem. Bio.* – 2000. – Vol. 7, № 8. – P. 569-581.
32. Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based

probes (AfBPs) for profiling of enzymes / H. Fang, B. Peng, S. Y. Ong et al. // *Chem. Sci.* – 2021. – Vol. 12, № 24. – P. 8288-8310.

33. Weerapana E. Tandem orthogonal proteolysis-activity-based protein profiling (TOP-ABPP) — a general method for mapping sites of probe modification in proteomes / E. Weerapana, A. E. Speers, B. F. Cravatt. // *Nat. Prot.* – 2007. – Vol. 2, № 6. – P. 1414-1425.

34. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes / E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon et al. // *Nat.* – 2010. – Vol. 468, № 7325. – P. 790-795.

35. Bachovchin D. A. Identification of selective inhibitors of uncharacterized enzymes by high-throughput screening with fluorescent activity-based probes / D. A. Bachovchin, S. Brown, H. Rosen et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 27, № 4. – P. 387-394.

36. A fluopol-ABPP HTS assay to identify PAD inhibitors / B. Knuckley, J. E. Jones, D. A. Bachovchin et al. // *Chem. Commun.* – 2010. – Vol. 46, № 38. – P. 7175-7177.

37. High-Throughput Kinetic Analysis for Target-Directed Covalent Ligand Discovery / G. B. Craven, D. P. Affron, C. E. Allen et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2018. – Vol. 57, № 19. – P. 5257-5261.

38. Leach A. R. *Molecular modelling: principles and applications* / A. R. Leach // Pearson education. – 2001. – 759 p.

39. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery / X. Y. Meng, H. Zhang, M. Mezei et al. // *Curr. Comput. Aided Drug Des.* – 2011. – Vol. 7, № 2. – P. 146-157.

40. Stanzione F. Use of molecular docking computational tools in drug discovery / F. Stanzione, I. Giangreco, J. Cole // *Prog. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 60. – P. 273-343.

41. Bianco G. Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods / G. Bianco, S. Forli, D. s. Goodsell et al. // *Protein Sci.* – 2016. – Vol. 25, № 1. – P. 295-301.

42. Docking covalent inhibitors: a parameter free approach to pose prediction and scoring / K. Zhu, K. W. Borelli, J. R. Greenwood et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2014. – Vol. 54, № 7. – P. 1932-1940.

43. Corbeli C. R. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 1. Development and validation of FITTED 1.0 / C. R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2007. – Vol. 47, № 2. – P. 435-449.

44. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking / G. Jones, P. Willett, R. C. Glen et al. // *J. Mol. Biol.* – 1997. – Vol. 267, № 3. – P. 727-748.

45. Abagyan R. ICM — A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation / R. Abagyan, M. Totrov, D. Kuznetsov // *J. Comput. Chem.* – 1994. – Vol. 15, № 5. – P. 488-506.

46. Docking Server. URL: <https://dockingserver.com/web> (дата обращения 08.03.2024)

47. Scarpino A. Comparative evaluation of covalent docking toolsю. / A. Scarpino, G. G. Ferenczy, G. M. Keserü // *J. Chem. Inf. Model.* – 2018. – Vol. 58, № 7. – P. 1441-1458.

48. CovalentDock: automated covalent docking with parameterized covalent linkage energy estimation and molecular geometry constraints / X. Ouyang, S. Zhou, C. T. To Su et al. // *J. Comput. Chem.* – 2013. – Vol. 34, № 4. – P. 326-336.

49. Structure-based virtual screening approach for discovery of covalently bound ligands / D. T. Warshaviak, G. Golan, K. W. Borrelli et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2014. – Vol. 54, № 7. – P. 1941-1950.

50. Ubiquitin proteasome system in immune regulation and therapeutics / S. A. Bhat, Z. Vasi, R. Adhikari et al. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 67. – P. 102310.1-22.

51. Jansen A. H. P. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases / A. H. P. Jansen, E. A. J. Reits, E. M. Hol // *Front. Mol. Neurosci.* – 2014. – Vol. 7. – P. 73.1-14.

52. Identification of small molecules disrupting the ubiquitin proteasome system in Malaria / L. Mata-Cantero, M. J. Chaparro, G. Colmenarejo et al. // *ACS Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 5, № 12. – P. 2105-2117.

53. Lilienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy / A. Lilienbaum // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 4, № 1. – P. 1-26.

54. Rationalizing PROTAC-mediated ternary complex formation using Rosetta / N. Bai, S. A. Miller, G. V. Andrianov et al. // *J. Chem. Inf. Model.* – 2021. – Vol. 61, № 3. – P. 1368-1382.

55. Varshavsky A. N-degron and C-degron pathways of protein degradation / A. Varshavsky // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2019. – Vol. 116, № 2. – P. 358-366.

56. Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1–Cullin–F box complex for ubiquitination and degradation / K. M. Sksmoto, K. B. Kim, A. Kumagai et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 2001. – Vol. 98, № 15. – P. 8554-8559.

57. Verdine G. L. The challenge of drugging undruggable targets in cancer: lessons learned from targeting BCL-2 family members / G. L. Verdine, L. D. Walensky // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, № 24. – P. 7264-7270.

58. Crews C. M. Targeting the undruggable proteome: the small molecules of my dreams / C. M. Crews // *Chem. Bio.* – 2010. – Vol. 17, № 6. – P. 551-555.

59. RNF4 is a growth inhibitor expressed in germ cells but not in human testicular tumors / R. Pero, F. Lembo, D. D. Vizio et al. // *J. Am. Pathol.* – 2001. – Vol. 159, № 4. – P. 1225-1230.

60. RNF 4 interacts with both SUMO and nucleosomes to promote the DNA damage response / L. M. Grocock, M. Nie, J. Prudden et al. // *EMBO Rep.* – 2014. – Vol. 15, № 5. – P. 601-608.

61. Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4 / A. Plechanova, E. G. Jaffray et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 18, № 9. – P. 1052-1059.

62. Antibody RING-mediated destruction of endogenous proteins / A. F. M. Ibrahim, L. Shen, M. H. Tatham et al. // *Mol. Cell.* – 2020. – Vol. 79, № 1.

– P. 155-166.

63. SUMO chain-induced dimerization activates RNF4 / A. Rojas-Fernandez, A. Plechanova, N. Hattersley et al. // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 53, № 6. – P. 880-892.

64. RNF4-dependent oncogene activation by protein stabilization / J. J. Thomas, M. Abed, J. Heuberger et al. // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 16, № 12. – P. 3388-3400.

65. Regulation of eIF2 α by RNF4 promotes melanoma tumorigenesis and therapy resistance / E. Avitan-Hersh, Y. Feng, A. O. Visman et al. // *J. Invest. Der.* – 2020. – Vol. 140, № 12. – P. 2466-2477.

66. The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor / F. J. Kaiser, G. T. G. Chang, B. Horsthemke et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 40. – P. 38780-38785.

67. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity / T. Ito, H. Ando, T. Suzuki et al. // *Sci.* – 2010. – Vol. 327, № 5971. – P. 1345-1350.

68. The MDM2 ligand Nutlin-3 differentially alters expression of the immune blockade receptors PD-L1 and CD276 / R. Li, P. Zatioukalova, P. Muller et al. // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2020. – Vol. 25. – P. 1-21.

69. Derivatization of inhibitor of apoptosis protein (IAP) ligands yields improved inducers of estrogen receptor α degradation / N. Ohoka, Y. Morita, K. Nagai et al. // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, № 18. – P. 6776-6790.

70. Targeting the von Hippel–Lindau E3 ubiquitin ligase using small molecules to disrupt the VHL/HIF-1 α interaction / D. L. Buckley, I. V. Molle, P. C. Gareiss et al. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134, № 10. – P. 4465-4468.

71. Belcher B. P. Ligandability of E3 ligases for targeted protein degradation applications / B. P. Belcher, C. C. Ward, D. K. Nomura // *Biochem.* – 2021. – Vol. 62, № 3. – P. 588-600.

72. Covalent ligand screening uncovers a RNF4 E3 ligase recruiter for targeted protein degradation applications / C. C. Ward, J. I. Kleinman, S. M. Brittain et al. // *ACS Chem. Biol.* – 2019. – Vol. 14, № 11. – P. 2430-2440.

73. RCSB Protein Data Bank (PDB). URL: <https://www.rcsb.org/> (дата обращения: 25.03.2024)
74. Protein Preparation Guide Schrodinger Suite 2012 Update 2, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012. – 54 p.
75. LigPrep 3.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – 94 p.
76. QikProp 4.4 User Manual, Glide version 6.4, Prime version 3.7, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – 46 p.
77. Feig M. Implicit solvation based on generalized Born theory in different dielectric environments / M. Feig, W. Im, C. L. Brooks et al. // J. Chem. Phys. – 2004. – Vol. 120, № 2. – P. 903-911.
78. Prime Schrödinger Release 2023-4: Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2023. – 156 p.
79. Desmond 4.2 User Manual, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – 166 p.
80. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins / A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott et al. // J. Phys. Chem. B. – 1998. – Vol. 102, № 18. – P. 3586-3616.
81. Desmond 3.1 User Manual, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012. – 162 p.
82. The maximal and current accuracy of rigorous protein-ligand binding free energy calculations / G. A. Ross, C. Lu, G. Scarabelli et al. // Commun. Chem. – 2023. – Vol. 6, №. 1. – P. 222.1-17.
83. Bennett C. H. Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data / C. H. Bennett // J. Comput. Phy. – 1976. – Vol. 22. – №. 2. – P. 245-268.
84. Epik 3.2 User Manual, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. – 64 p.
85. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space / C. Lu, C. Wu, D. Ghoreishi et al. // J. Chem. Theory Comput. – 2021. – Vol. 17, № 7. – P. 4291-4300.

Приложение А

Отчеты молекулярно-динамической симуляции

Отчет А.1 Молекулярно-динамическая симуляция нативного лиганда лучшего по CDock Affinity для мономера

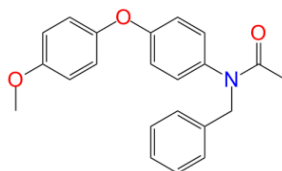


Рисунок А.1.1 – Структура нативного лиганда

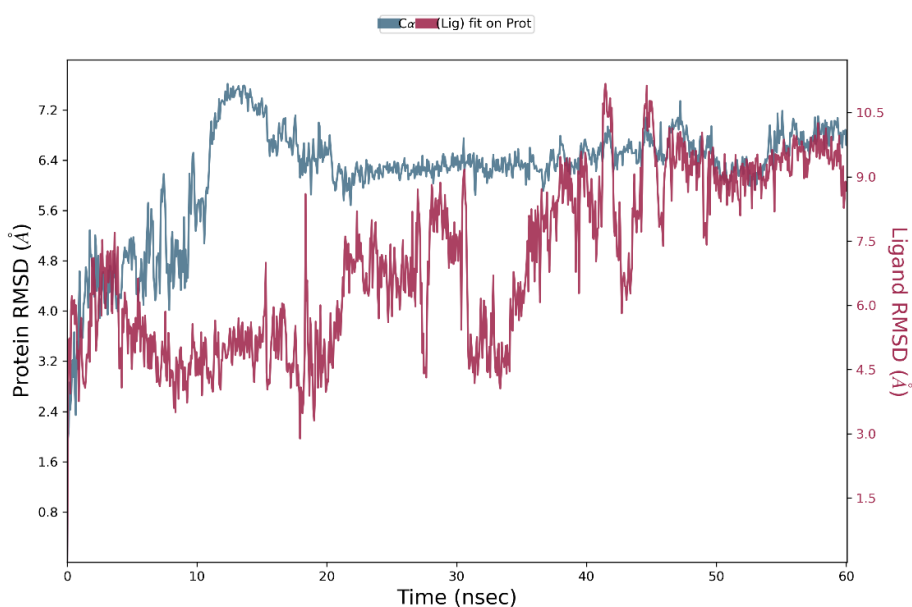


Рисунок А.1.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

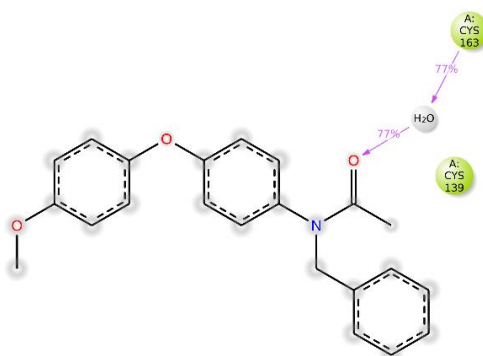


Рисунок А.1.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда лучшего по CDock Affinity с остатками мономера

Продолжение Приложения А

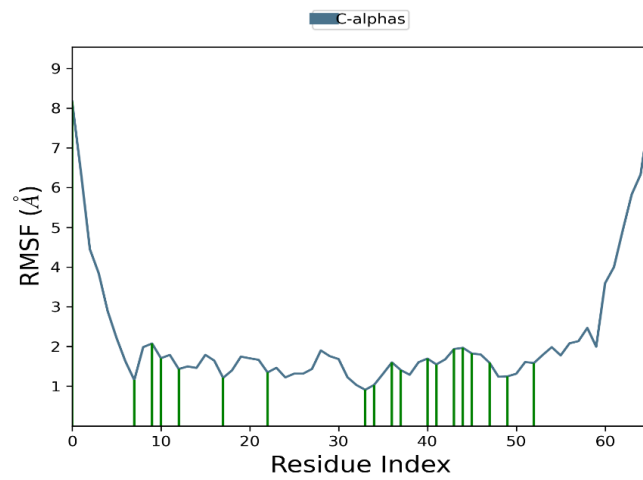


Рисунок А.1.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка мономера

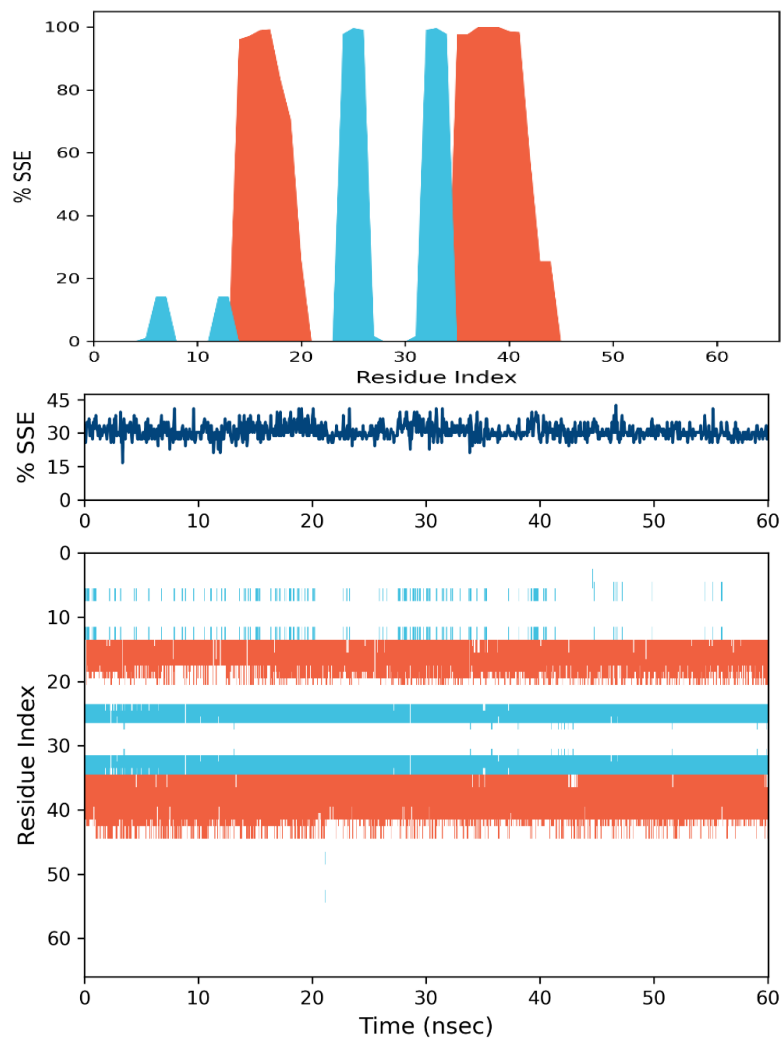


Рисунок А.1.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка (мономера)

Продолжение Приложения А

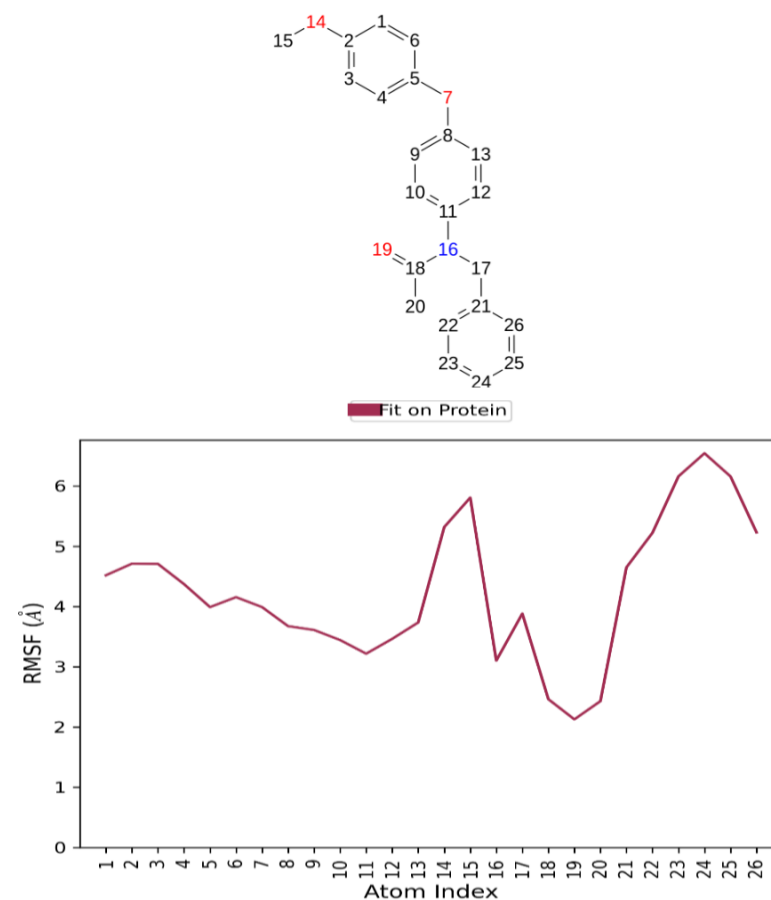


Рисунок А.1.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда лучшего по CDock Affinity

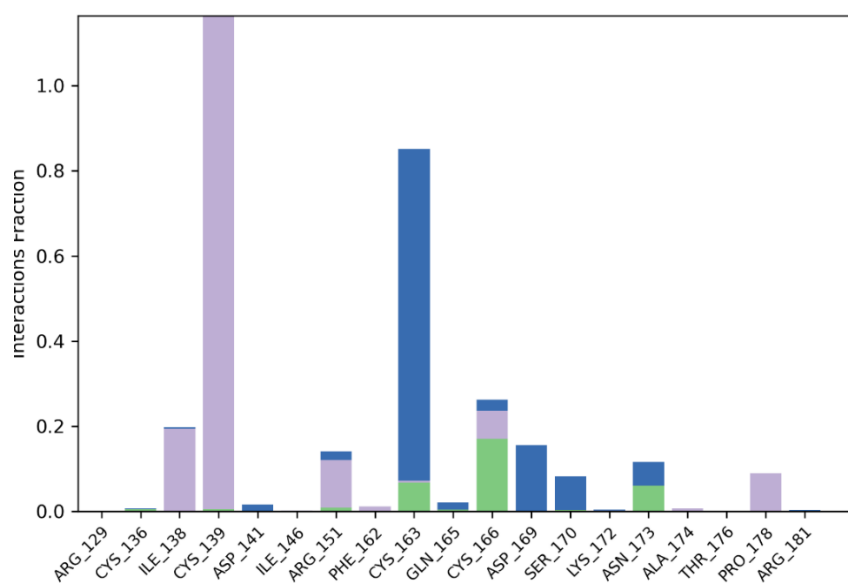


Рисунок А.1.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом лучшим по CDock Affinity

Продолжение Приложения А

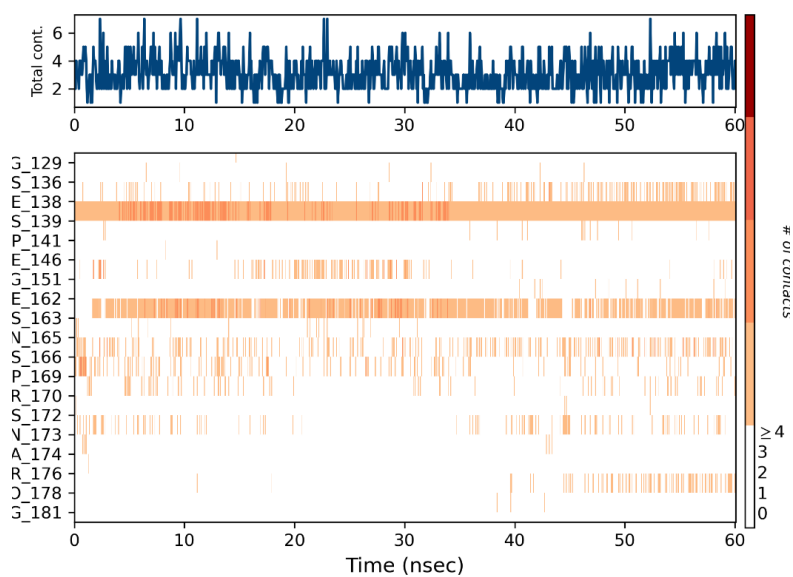


Рисунок А.1.8 – Карта взаимодействия остатков мономера с лигандом

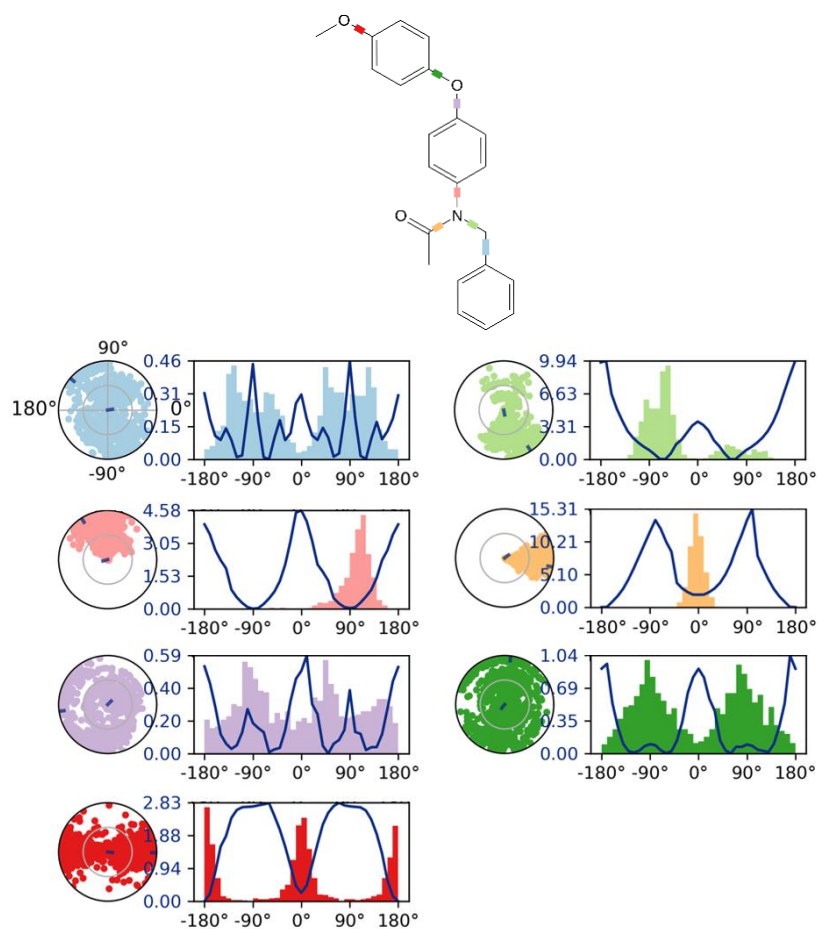


Рисунок А.1.9 – Конформационный профиль лиганда лучшего по CDock Affinity

Продолжение Приложения А

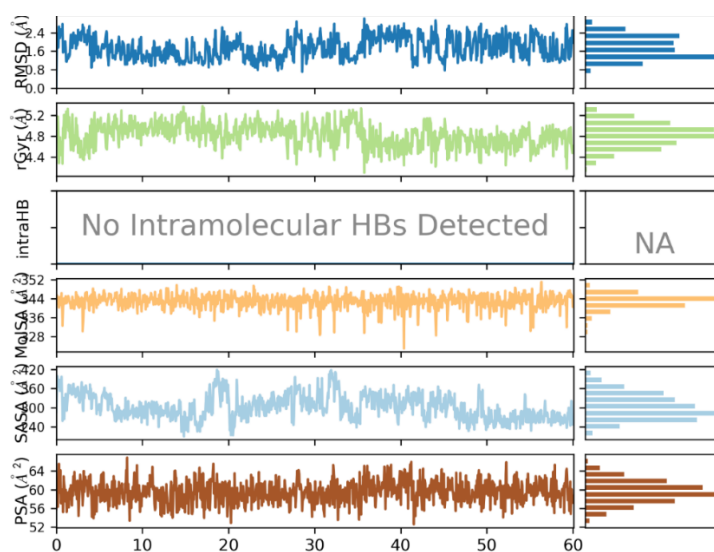


Рисунок А.1.10 – Свойства нативного лиганда (поза лучшая по CDock Affinity)

Отчет А.2. Молекулярно-динамическая симуляция нативного лиганда лучшего по Prime Energy для мономера

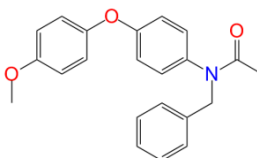


Рисунок А.2.1 – Структура нативного лиганда

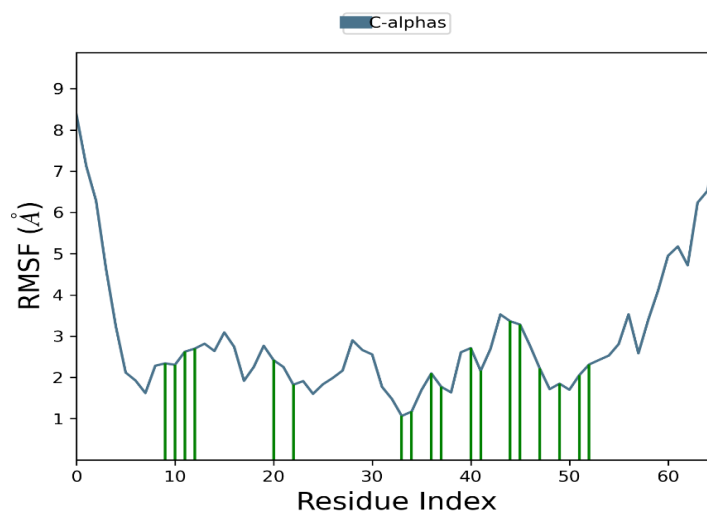


Рисунок А.2.2 – График зависимости RMSF от индекса остатка мономера

Продолжение Приложения А

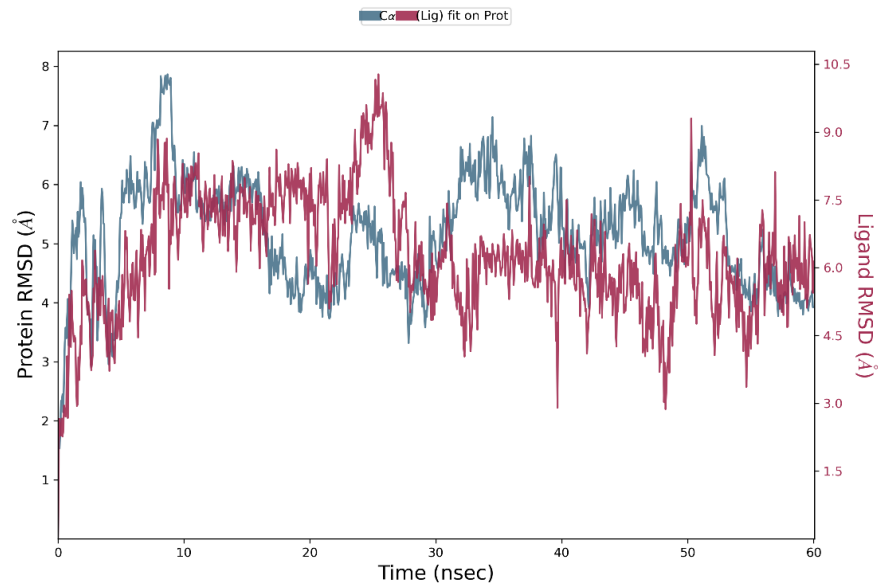


Рисунок А.2.3 – График зависимости RMSD от времени моделирования

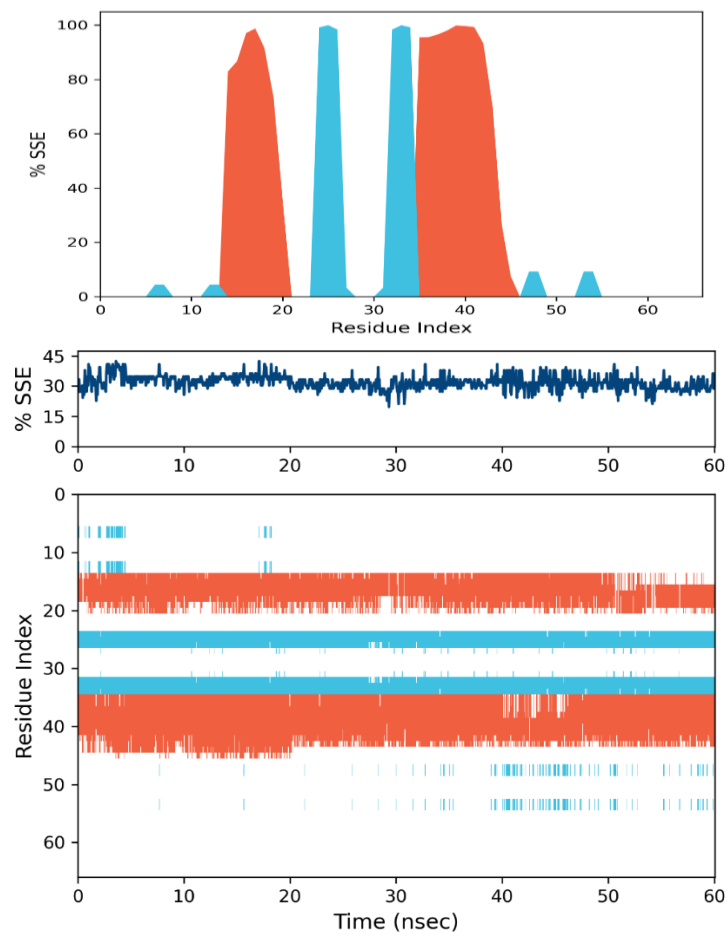


Рисунок А.2.4 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка (мономер)

Продолжение Приложения А

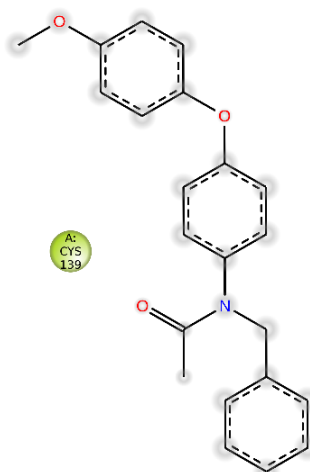


Рисунок А.2.5 – Детальное взаимодействие атомов лиганда лучшего по Prime Energy с остатками мономера

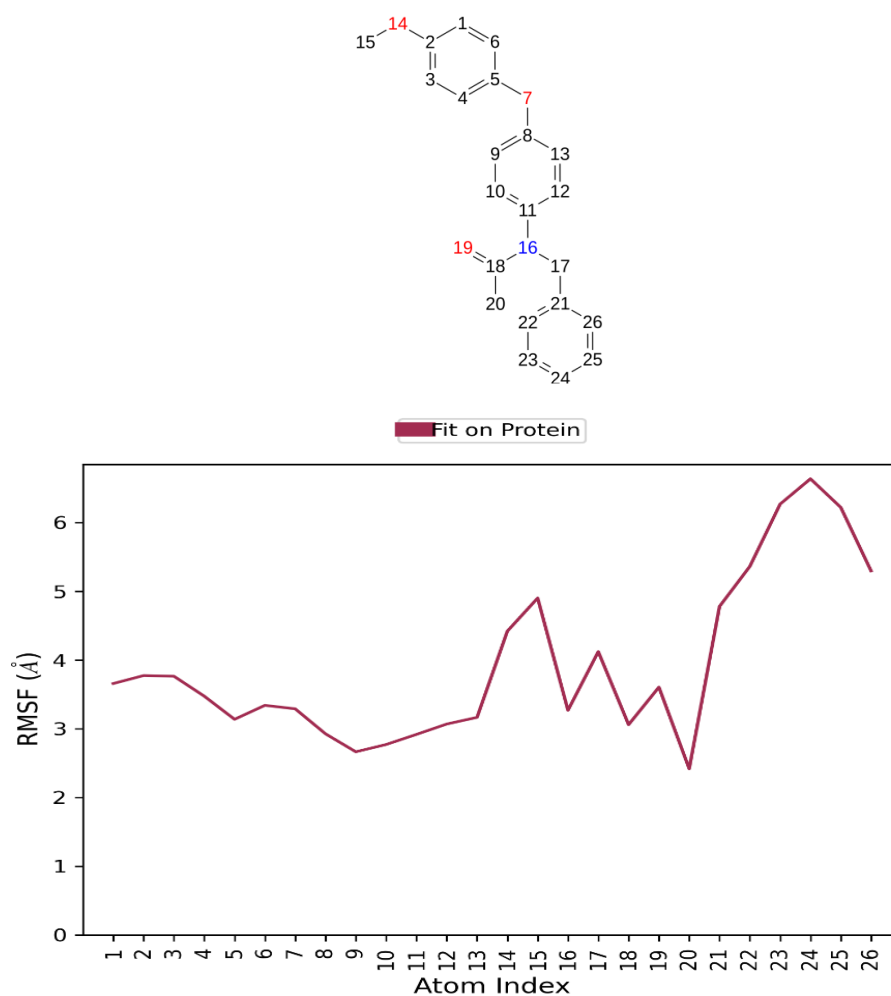


Рисунок А.2.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда лучшего по Prime Energy

Продолжение Приложения А

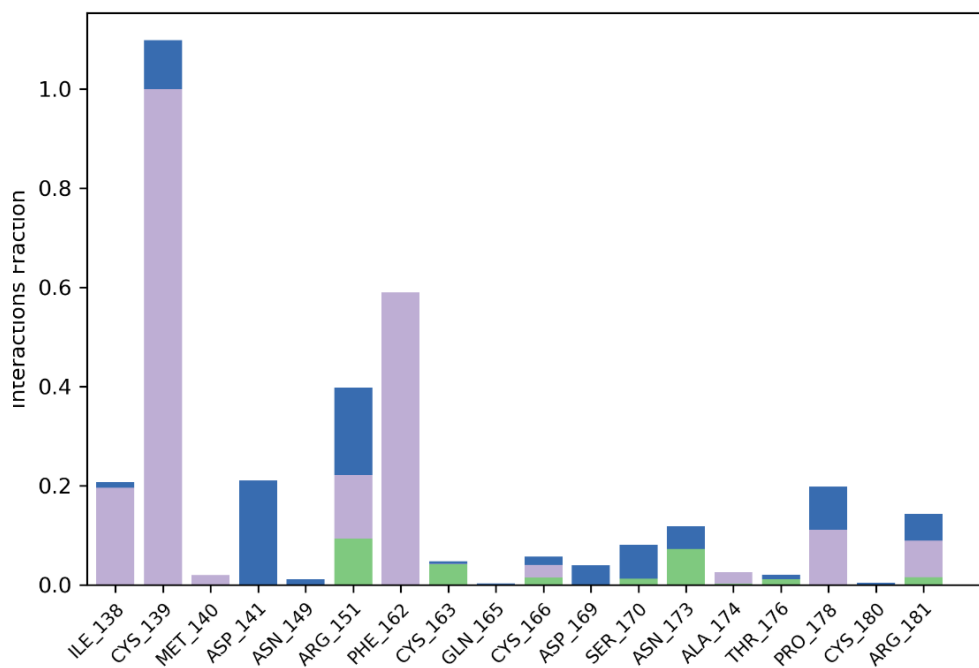


Рисунок А.2.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом лучшим по Prime Energy

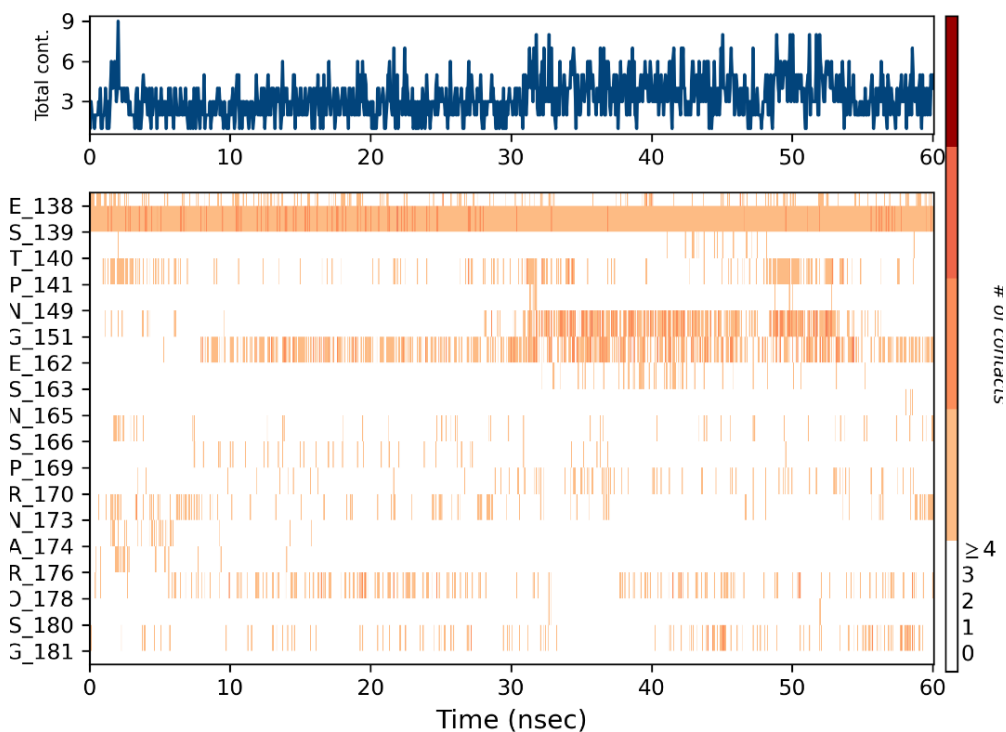


Рисунок А.2.8 – Карта взаимодействия остатков мономера с лигандом

Продолжение Приложения А

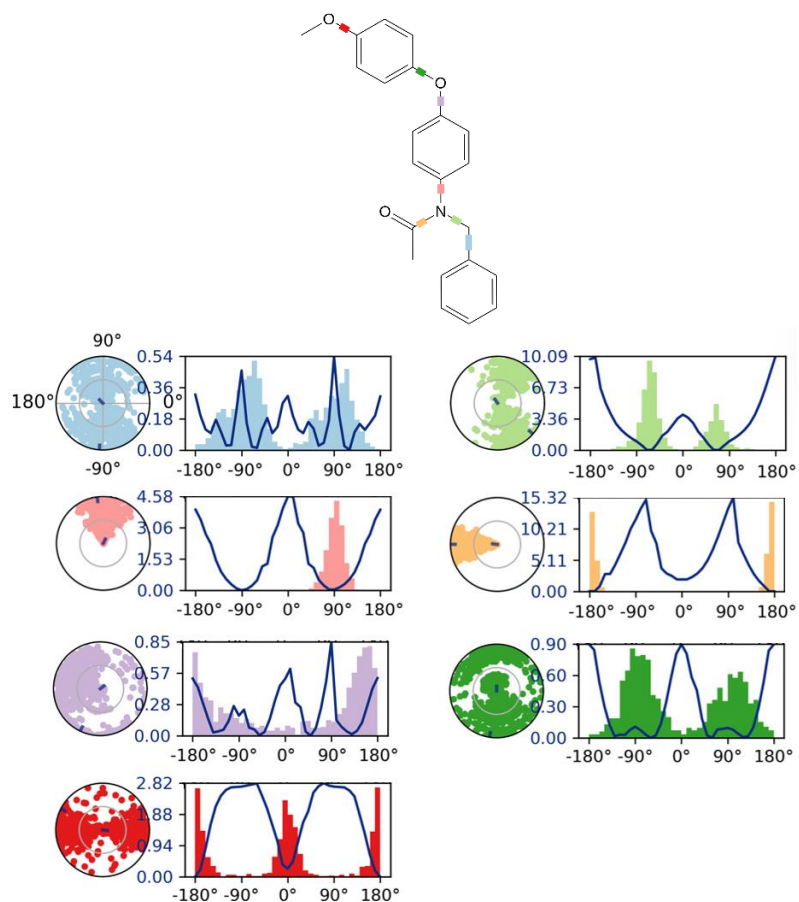


Рисунок А.2.9 – Конформационный профиль лиганда лучшего по Prime Energy

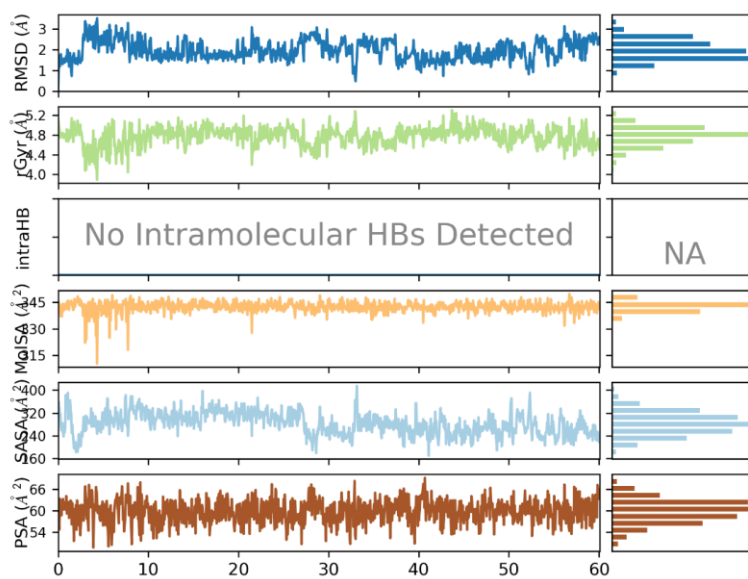


Рисунок А.2.10 – Свойства нативного лиганда (поза лучшая по Prime Energy)

Продолжение Приложения А

Отчет А.3. Молекулярно-динамическая симуляция нативного лиганда лучшего по ММ-GBSA ΔG_{bind} для мономера

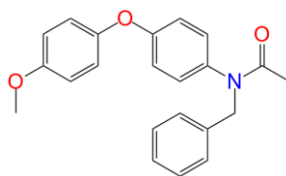


Рисунок А.3.1 – Структура нативного лиганда

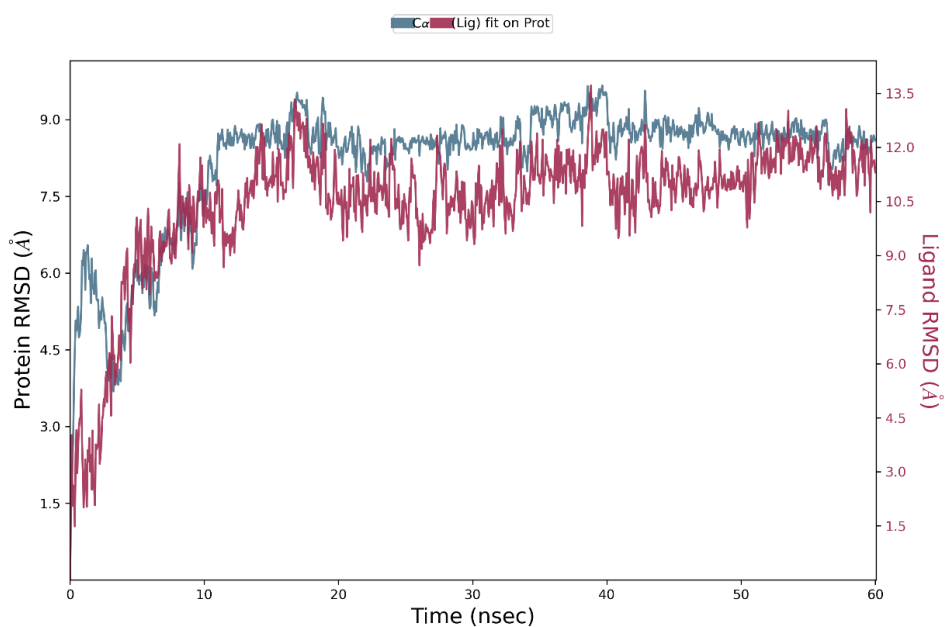


Рисунок А.3.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

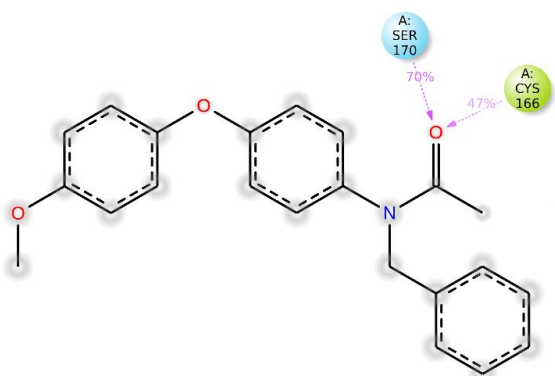


Рисунок А.3.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда лучшего по ММ-GBSA ΔG_{bind} с остатками мономера

Продолжение Приложения А

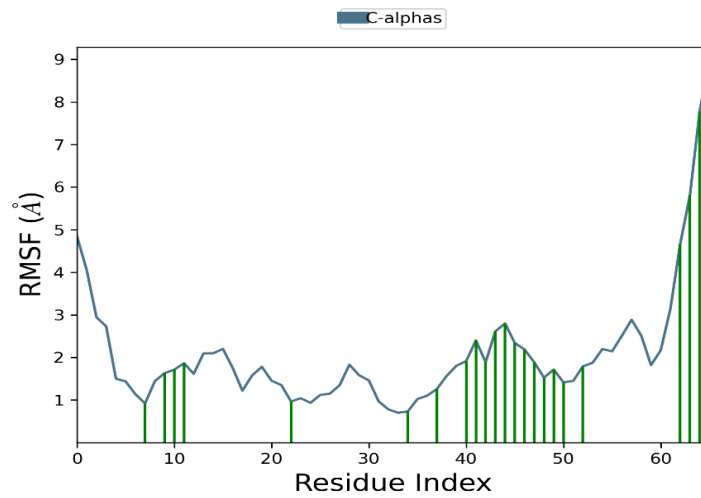


Рисунок А.3.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка мономера

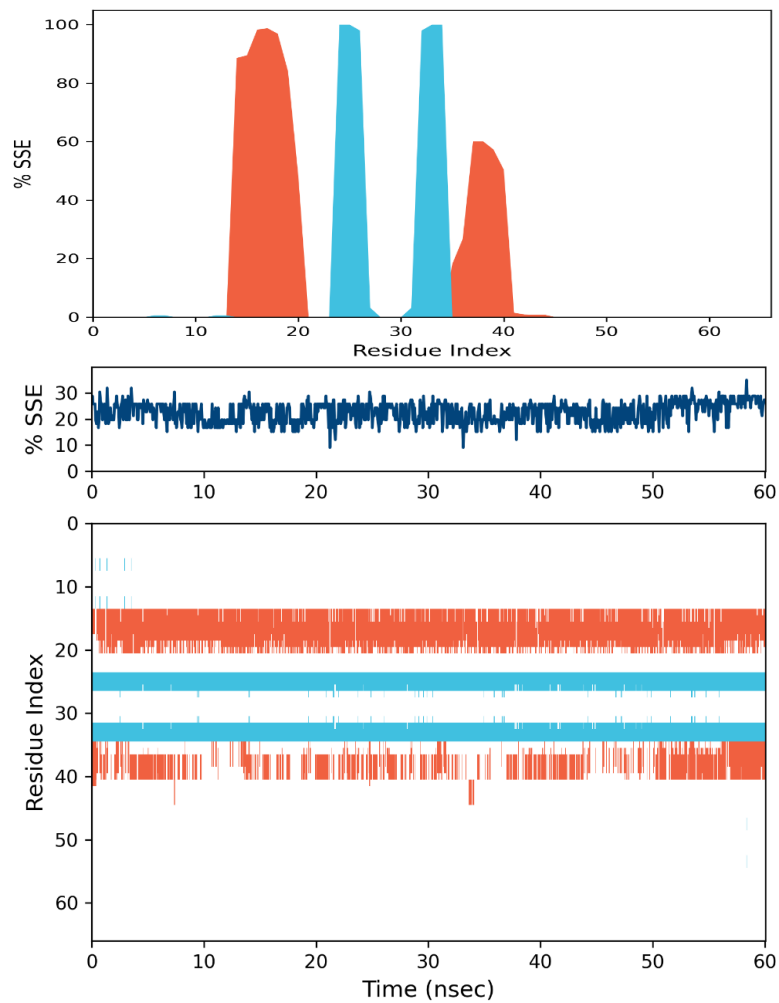


Рисунок А.3.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка (мономера)

Продолжение Приложения А

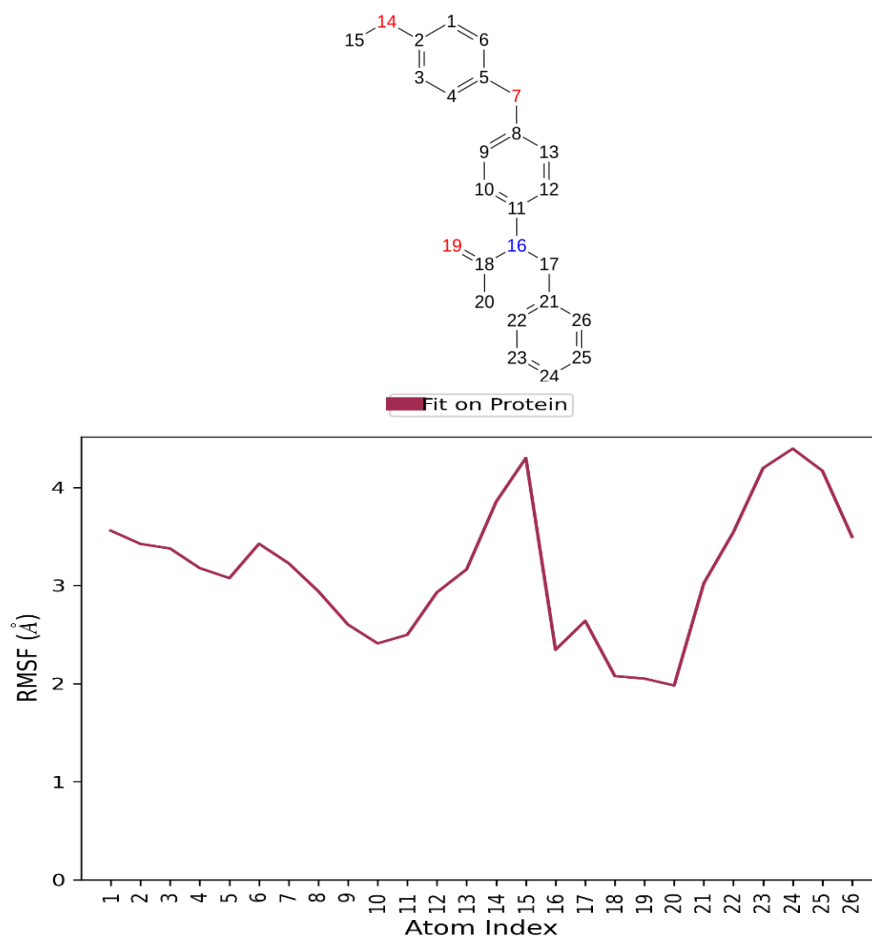


Рисунок А.3.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда лучшего по ММ-GBSA ΔG_{bind}

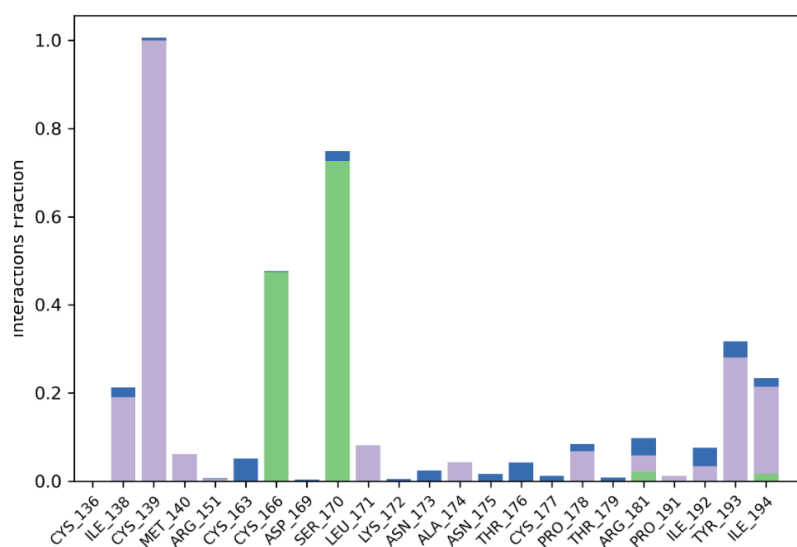


Рисунок А.3.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом лучшим по ММ-GBSA ΔG_{bind}

Продолжение Приложения А

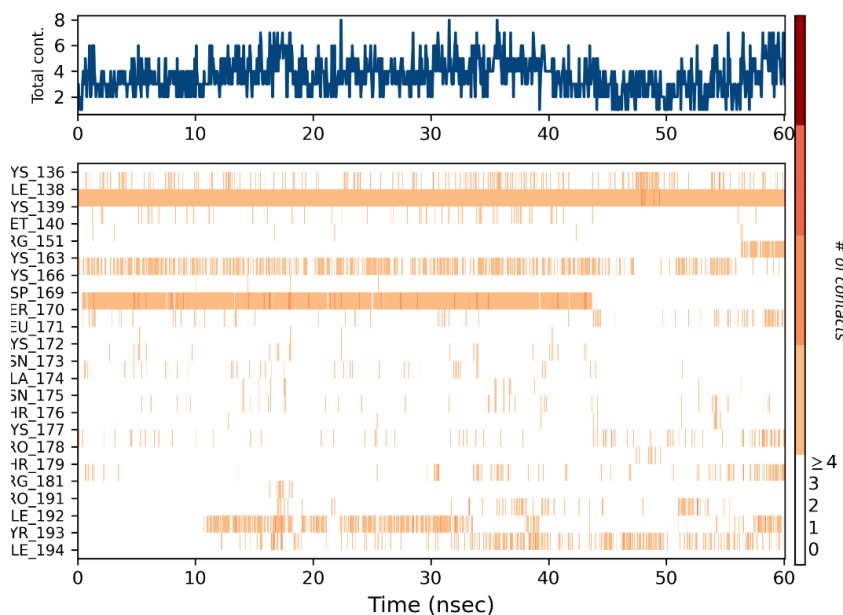


Рисунок А.3.8 – Карта взаимодействия остатков мономера с лигандом

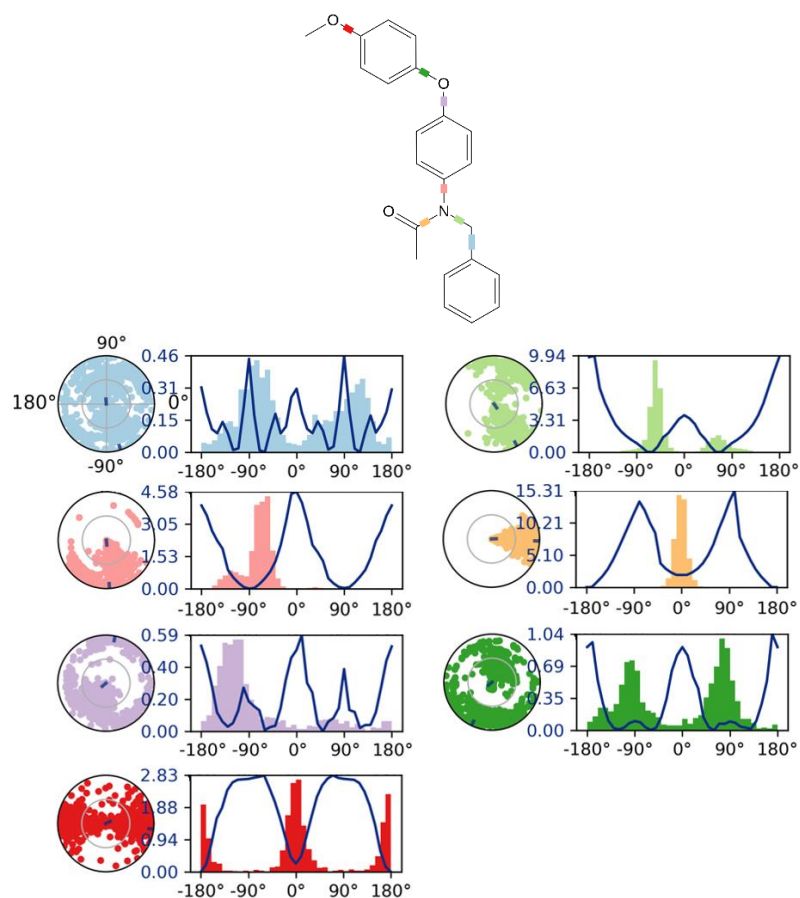


Рисунок А.3.9 – Конформационный профиль лиганда лучшего по ММ-GBSA ΔG_{bind}

Продолжение Приложения А

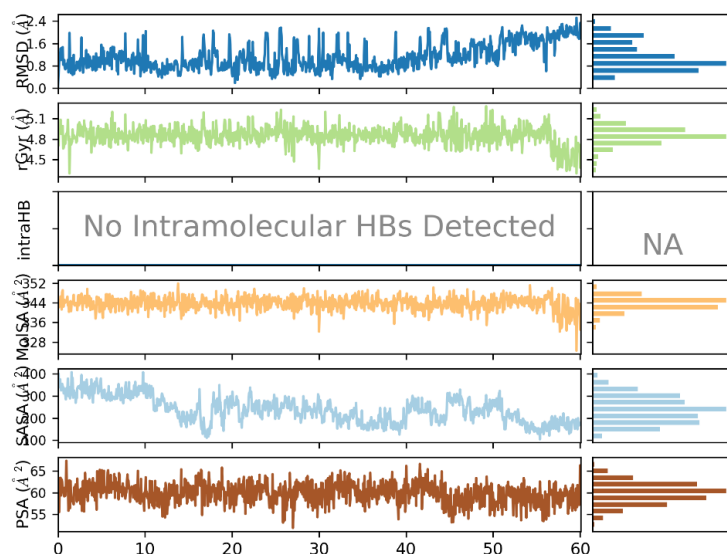


Рисунок А.3.10 – Свойства нативного лиганда (поза лучшая по ММ-GBSA ΔG_{bind})

Отчет А.4. Молекулярно-динамическая симуляция нативного лиганда худшего по Prime Energy для мономера

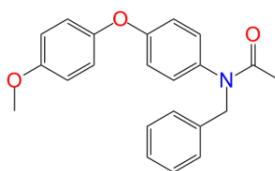


Рисунок А.4.1 – Структура нативного лиганда

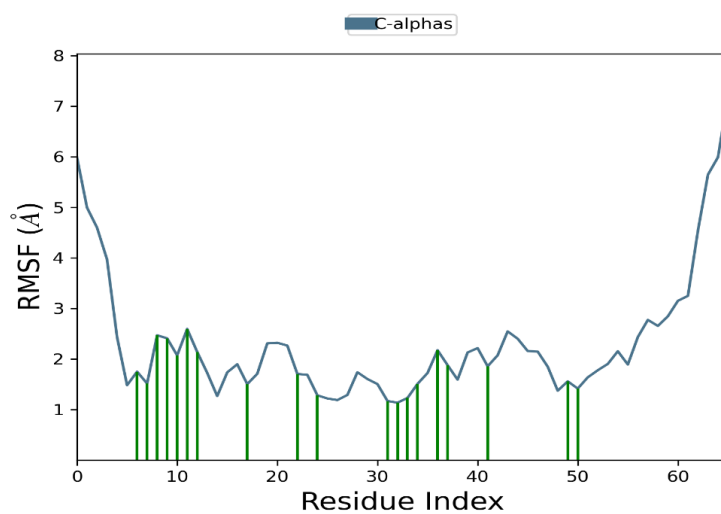


Рисунок А.4.2 – График зависимости RMSF от индекса остатка мономера

Продолжение Приложения А

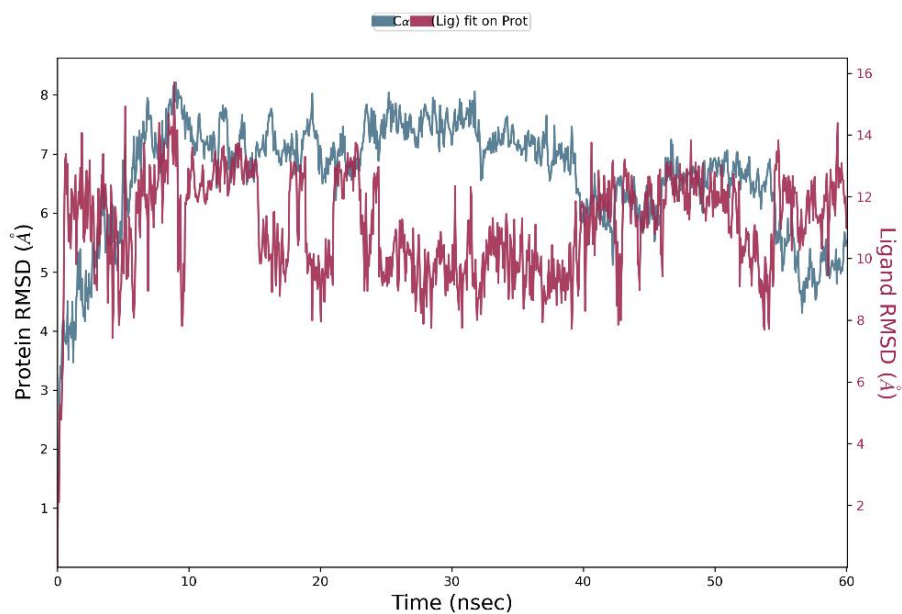


Рисунок А.4.3 – График зависимости RMSD от времени моделирования

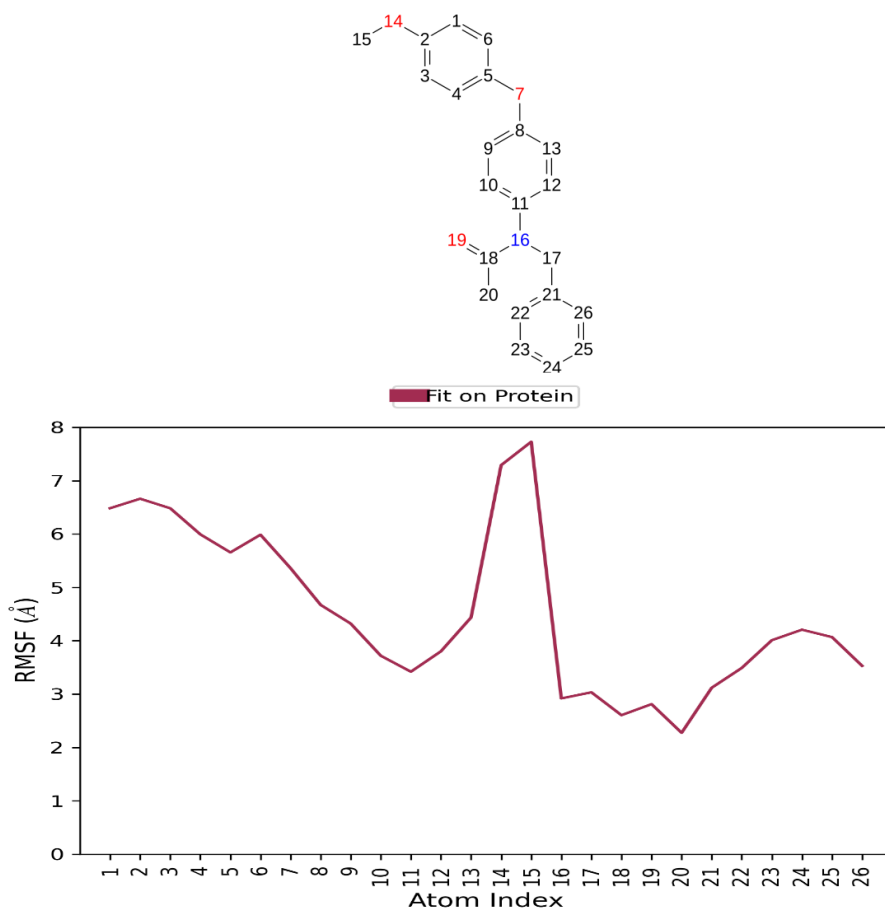


Рисунок А.4.4 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда худшего по Prime Energy

Продолжение Приложения А

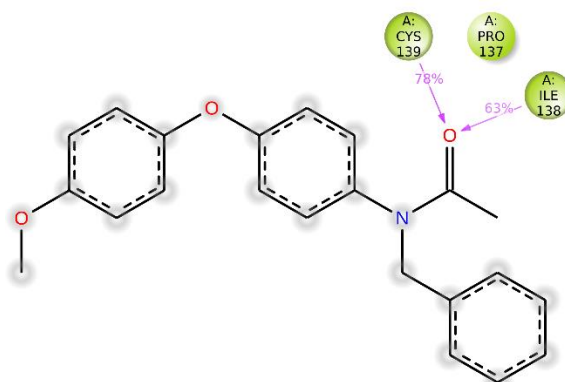


Рисунок А.4.5 – Детальное взаимодействие атомов лиганда худшего по Prime Energy с остатками мономера

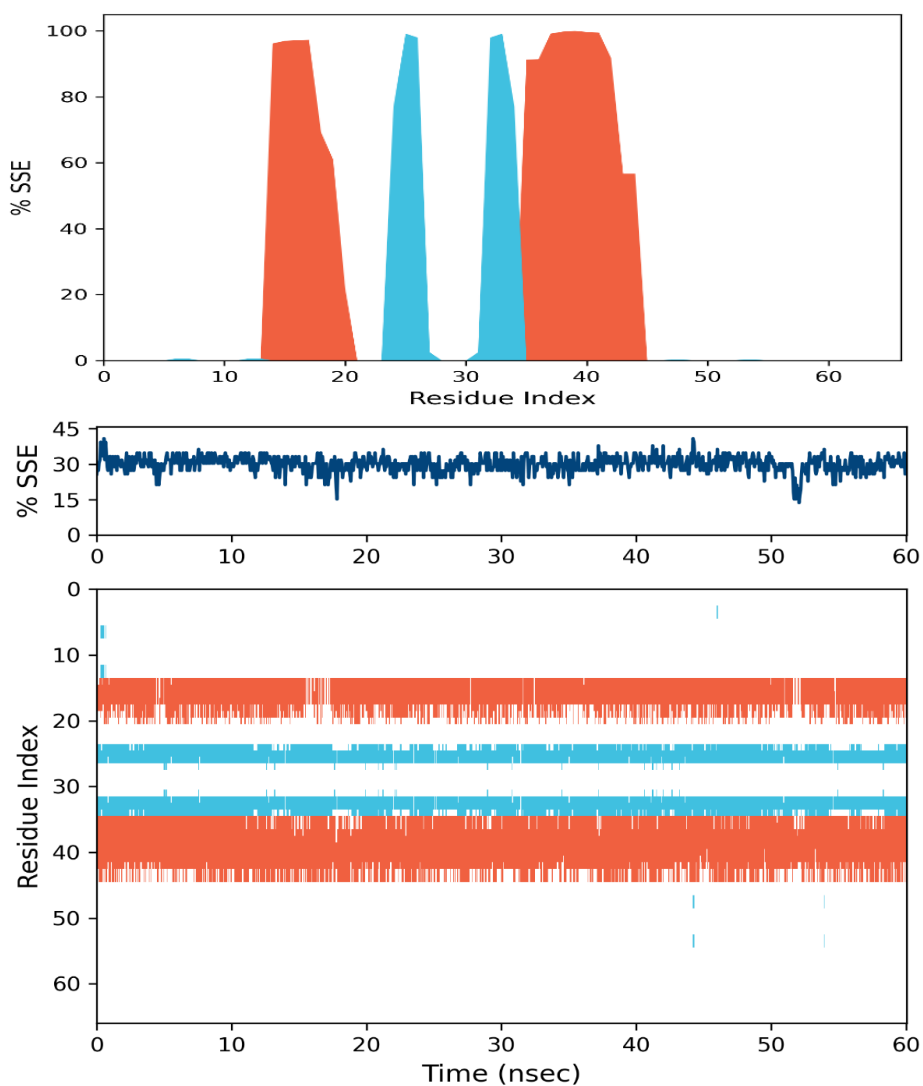


Рисунок А.4.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка (мономера)

Продолжение Приложения А

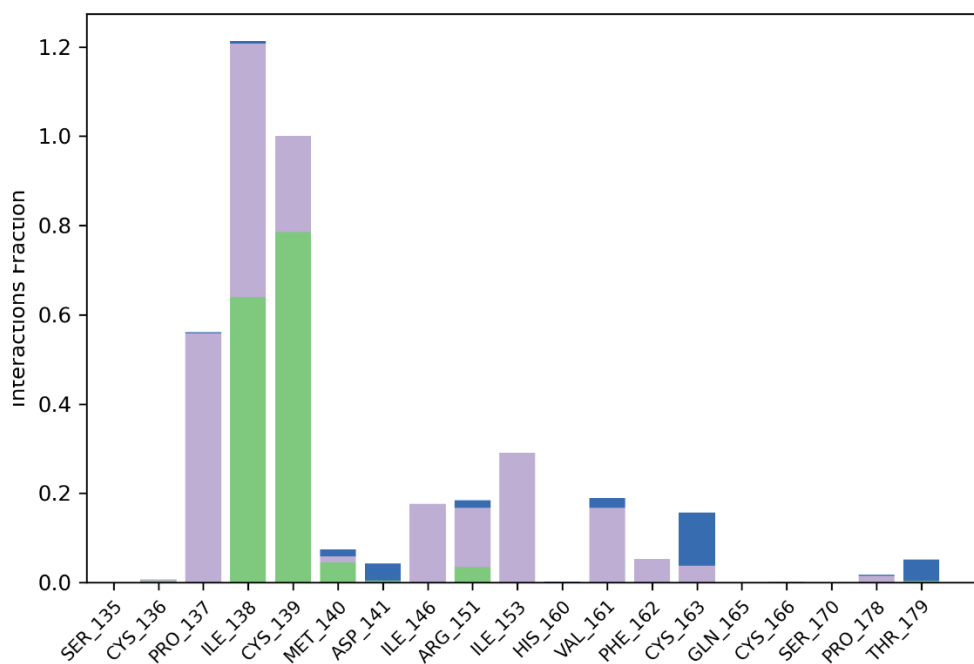


Рисунок А.4.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом худшим по Prime Energy

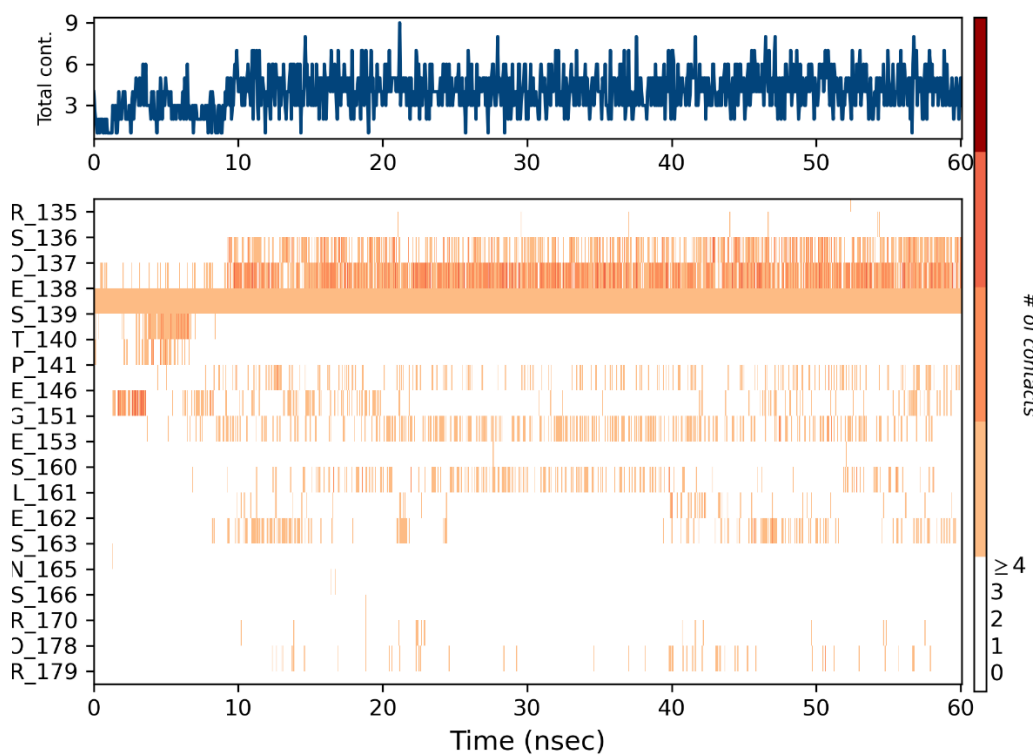


Рисунок А.4.8 – Карта взаимодействия остатков мономера с лигандом

Продолжение Приложения А

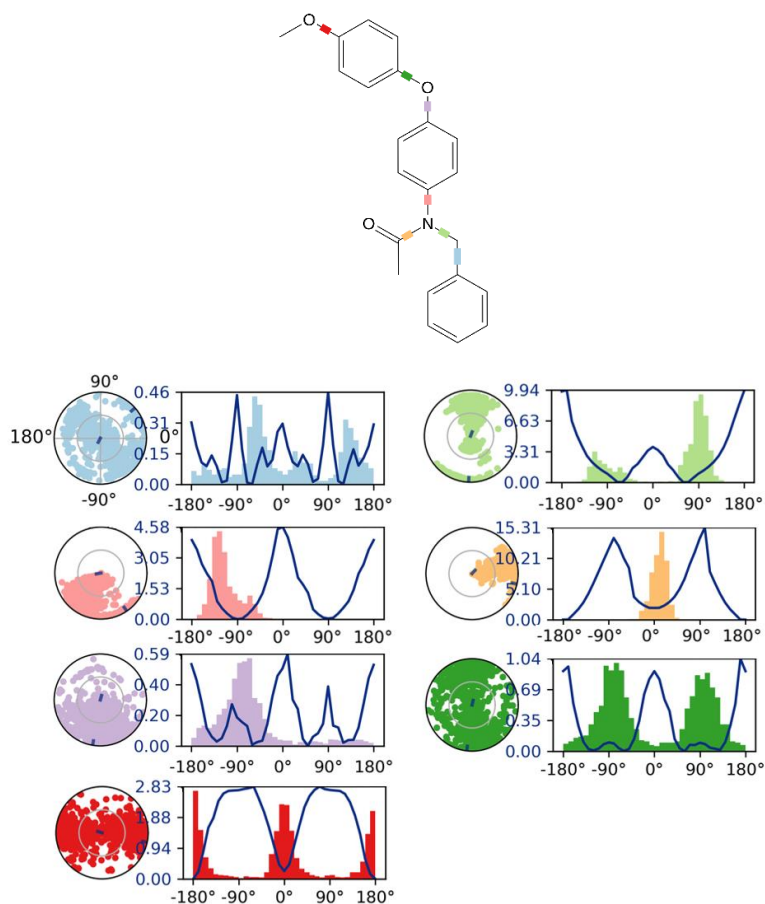


Рисунок А.4.9 – Конформационный профиль лиганда худшего по Prime Energy

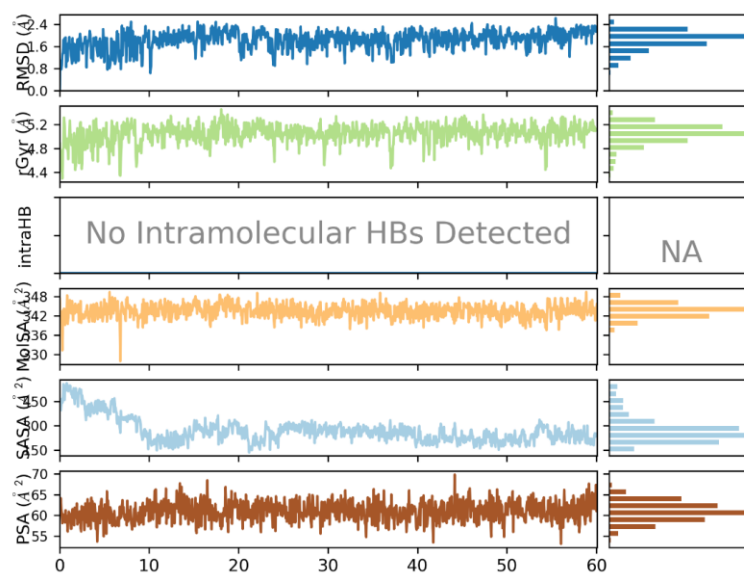


Рисунок А.4.10 – Свойства нативного лиганда (поза худшая по Prime Energy)

Отчет А.5. Молекулярно-динамическая симуляция нативного лиганда лучшего по Prime Energy для димера

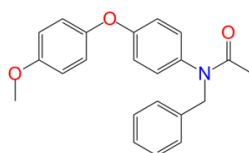


Рисунок А.5.1 – Структура нативного лиганда

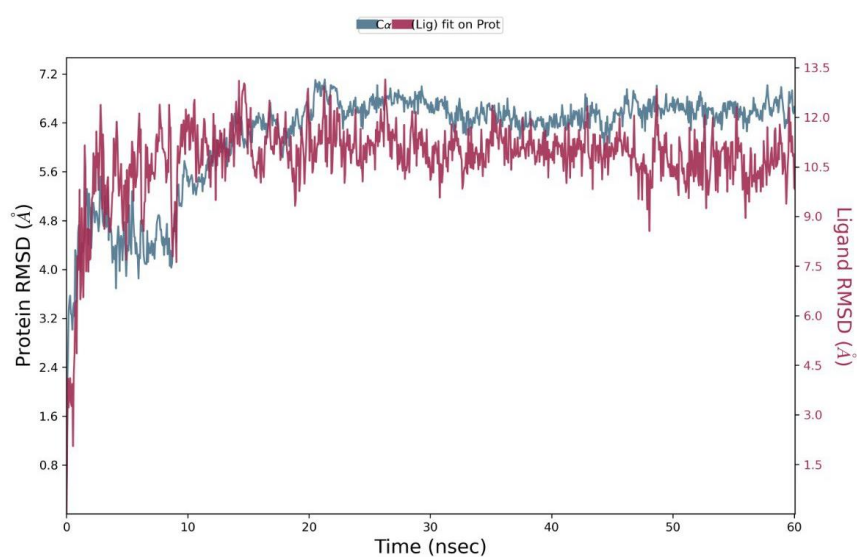


Рисунок А.5.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

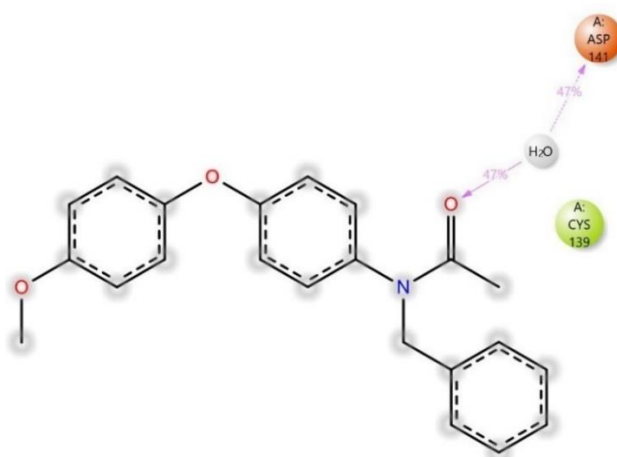


Рисунок А.5.3 – Детальное взаимодействие атомов лиганда лучшего по Prime Energy с остатками димера

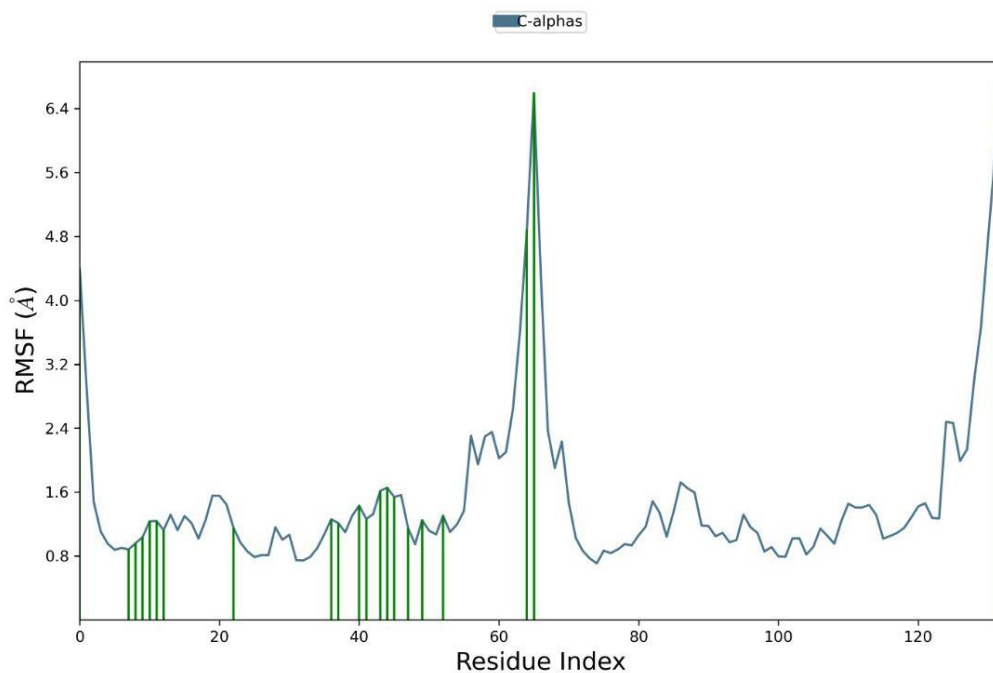


Рисунок А.5.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка димера

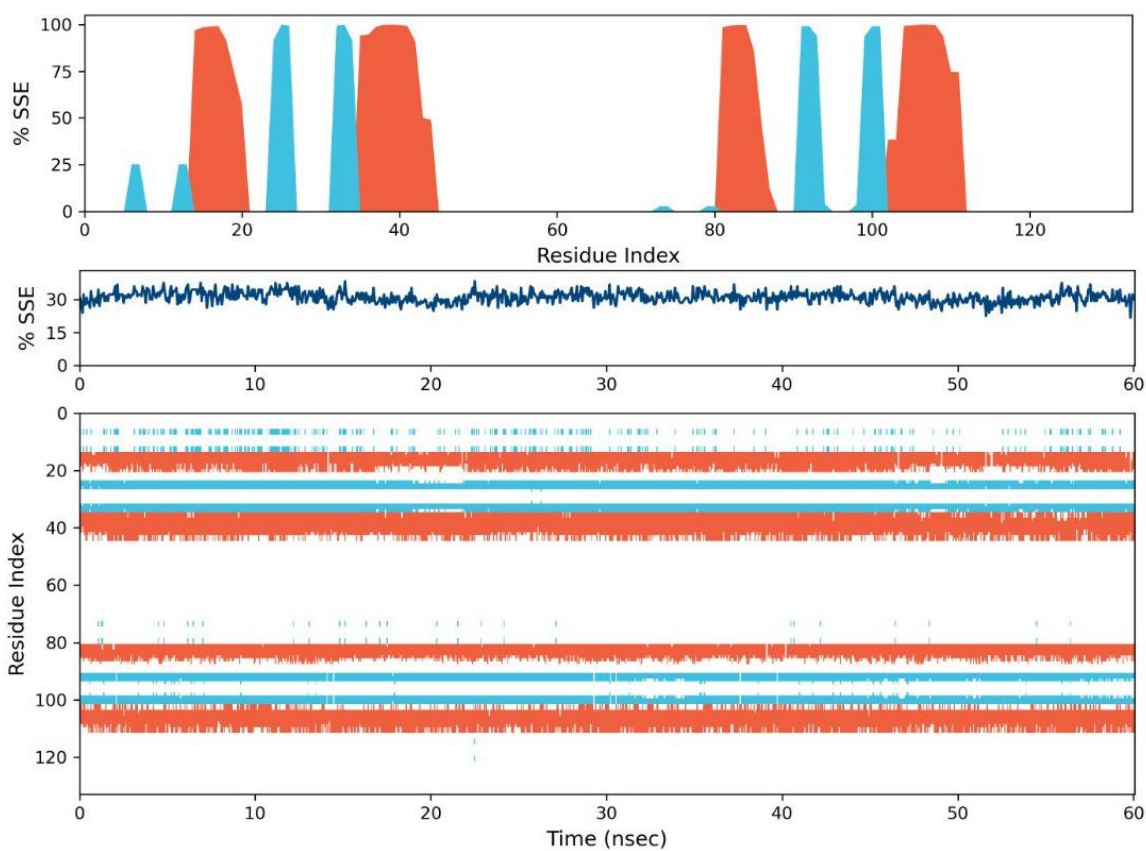


Рисунок А.5.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка (димера)
Продолжение Приложения А

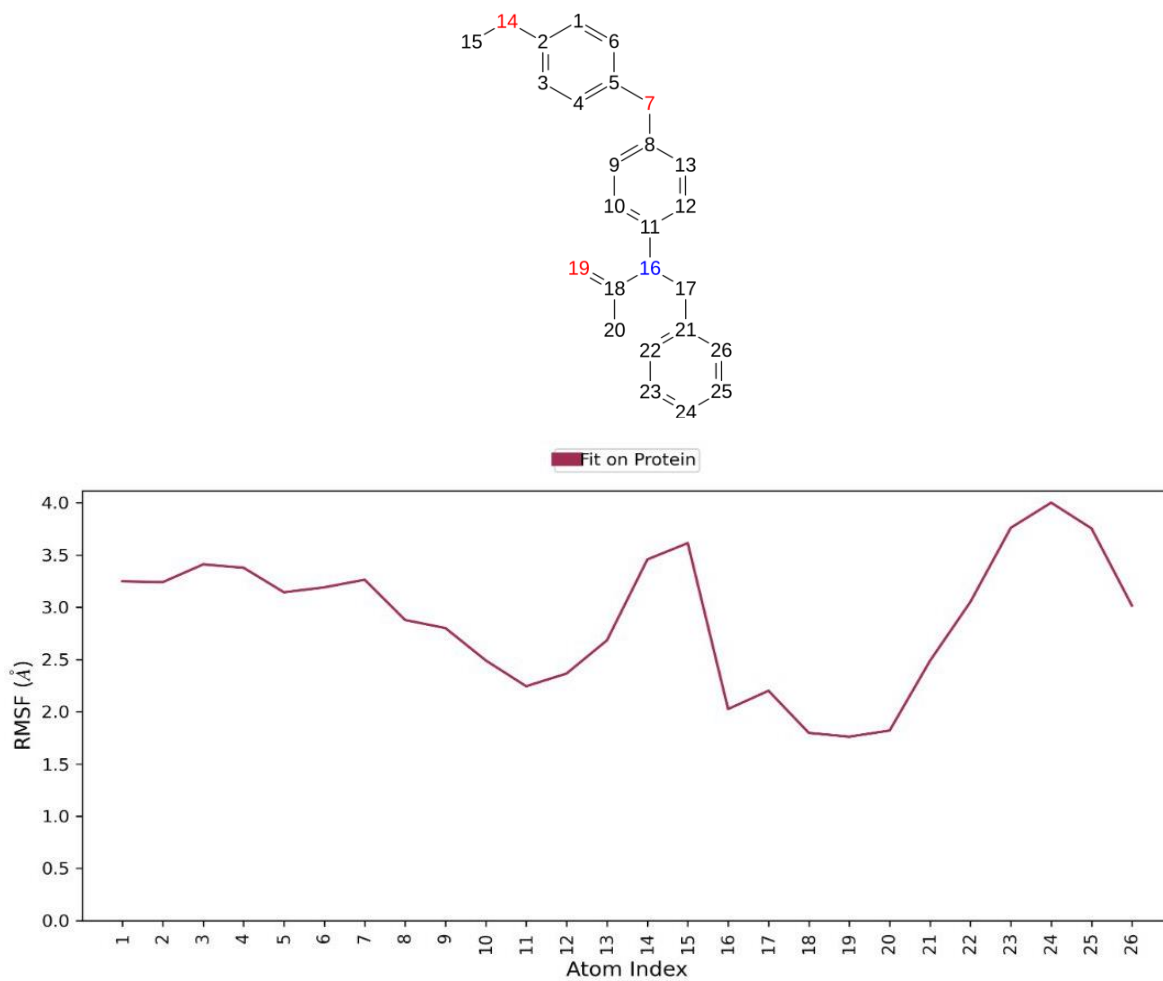


Рисунок А.5.6 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда лучшего по Prime Energy

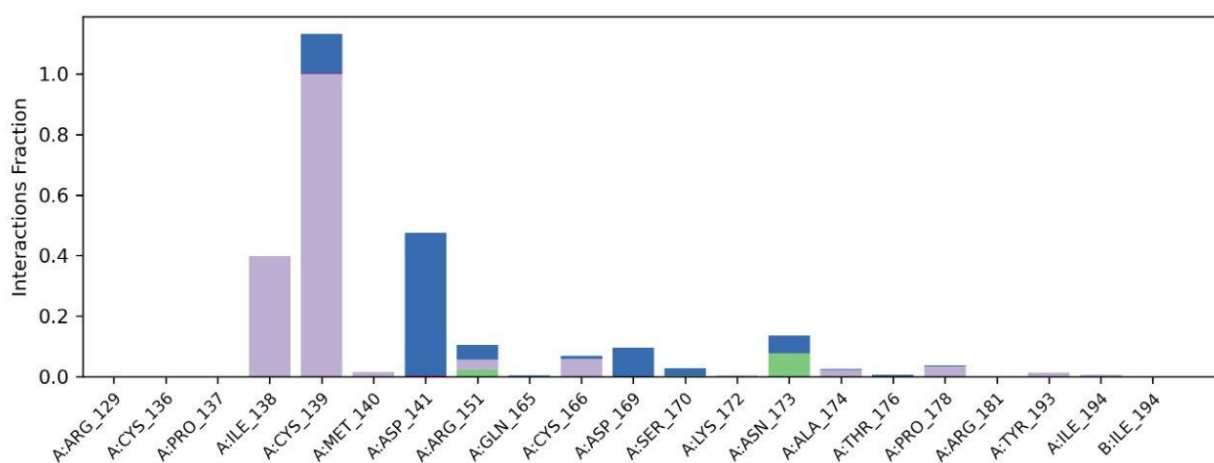


Рисунок А.5.7 – Диаграмма взаимодействия белка (димера) с лигандом лучшим по Prime Energy

Продолжение Приложения А

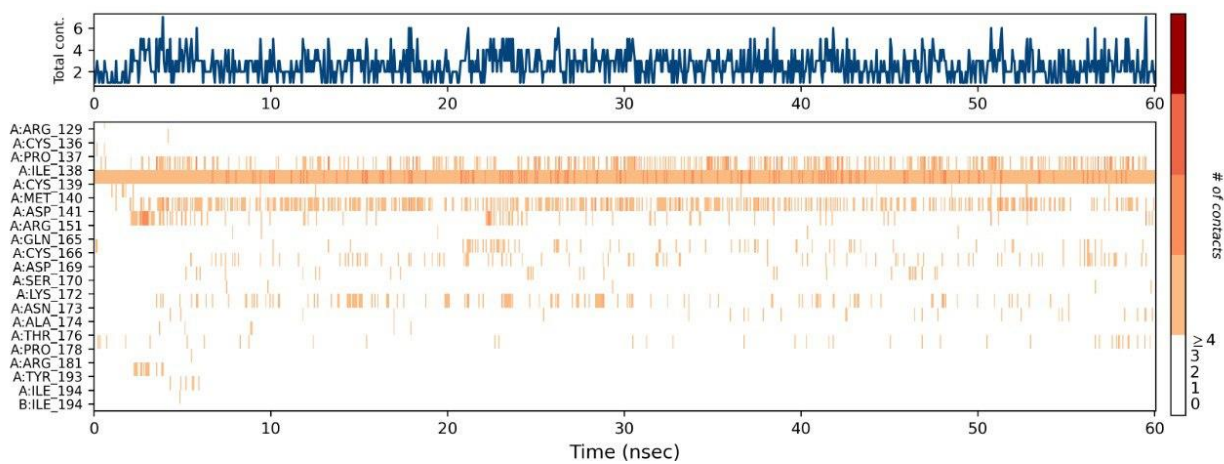


Рисунок А.5.8 – Карта взаимодействия остатков димера с лигандом

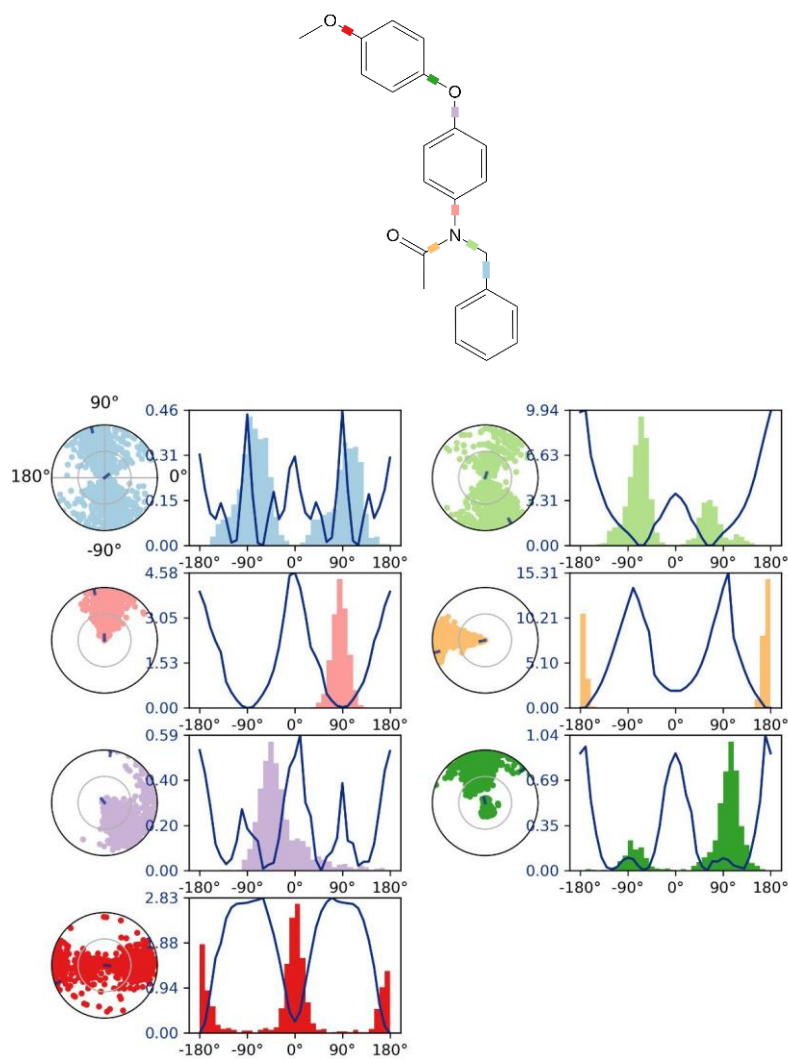


Рисунок А.5.9 – Конформационный профиль лиганда лучшего по Prime Energy для димера
Продолжение Приложения А

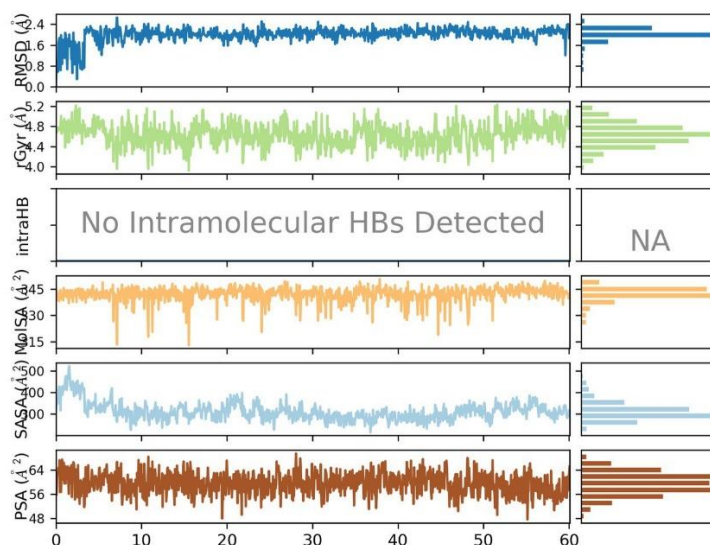


Рисунок А.5.10 – Свойства нативного лиганда (лучший по Prime Energy для димера)

Отчет А.6. Молекулярно-динамическая симуляция соединения ZE09-1182

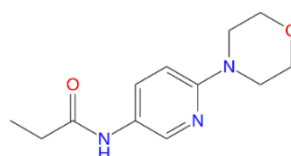


Рисунок А.6.1 – Структура лиганда ZE09-1182

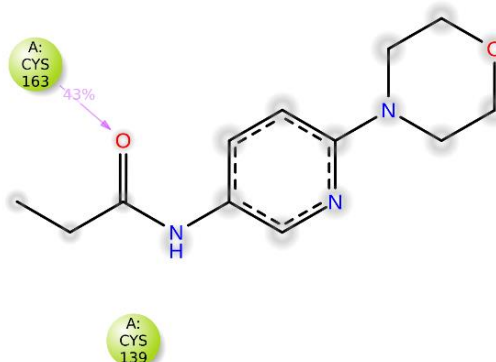


Рисунок А.6.2 – Детальное взаимодействие атомов ZE09-1182 с остатками белка

Продолжение Приложения А

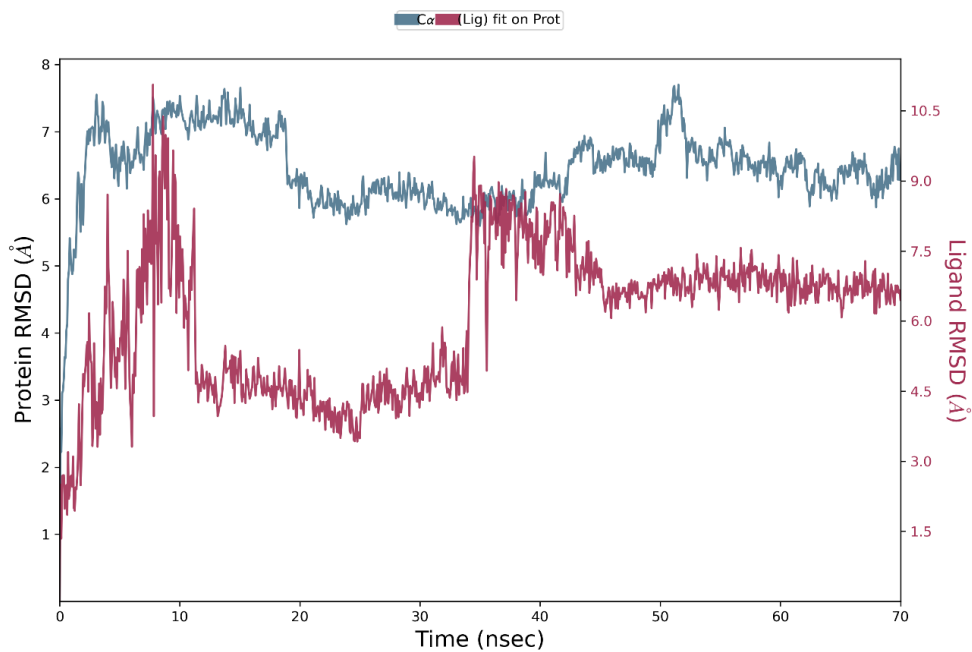


Рисунок А.6.3 – График зависимости RMSD от времени моделирования

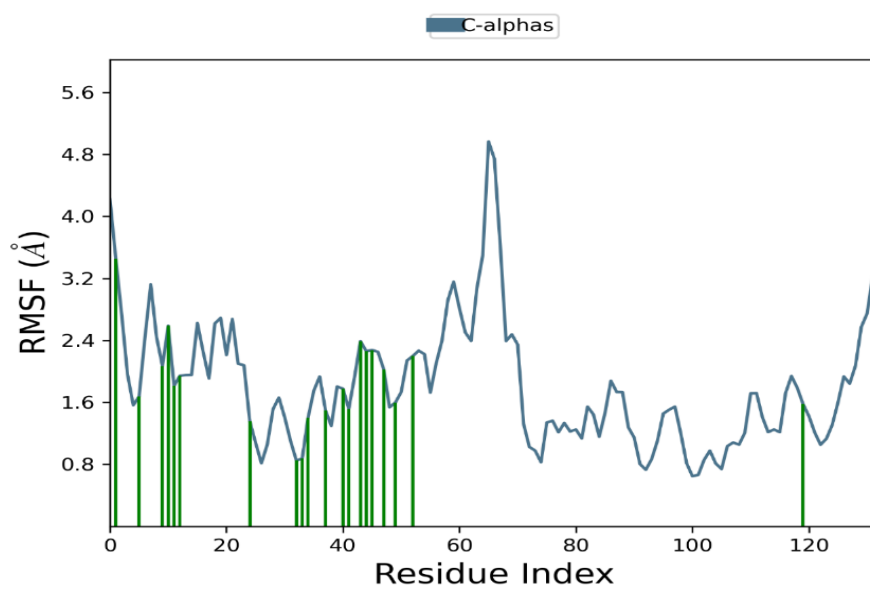


Рисунок А.6.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

Продолжение Приложения А

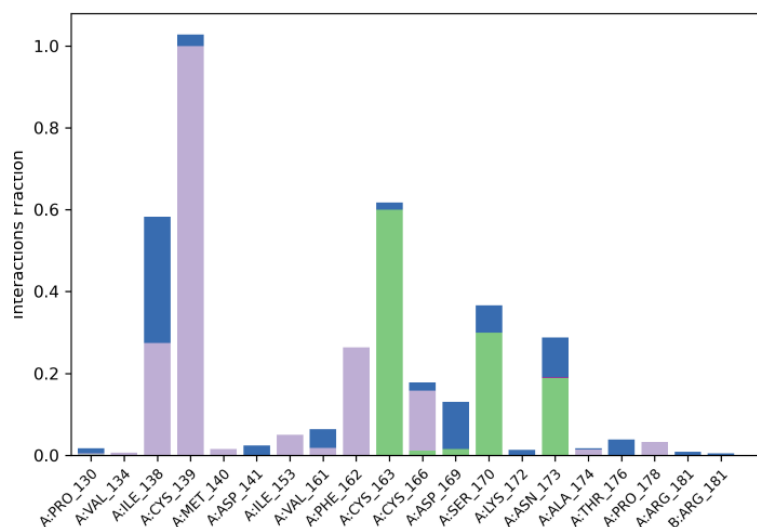


Рисунок А.6.5 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом ZE09-1182

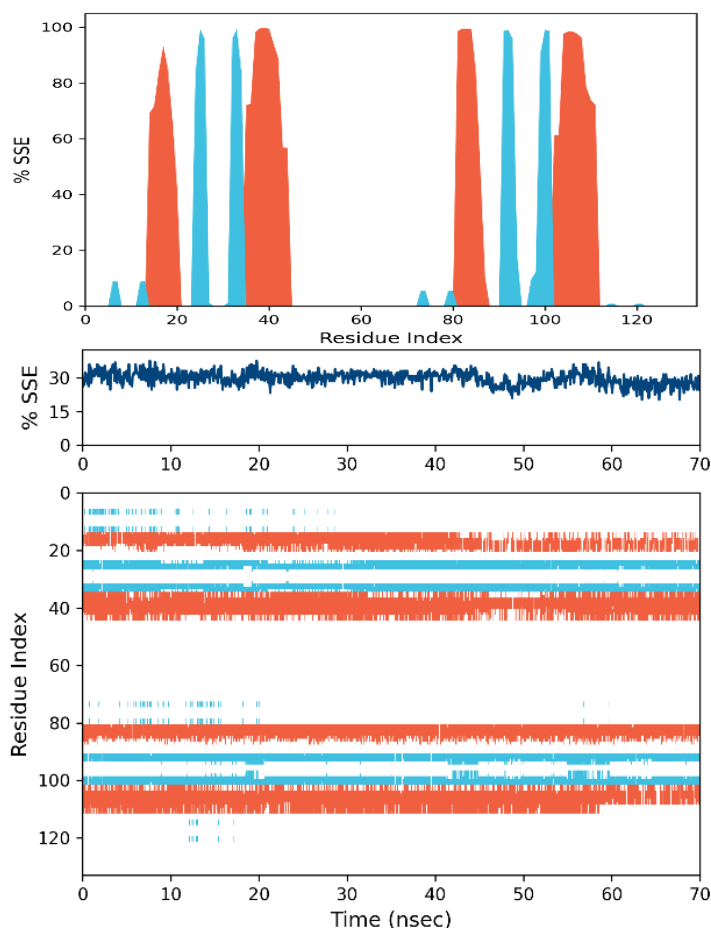


Рисунок А.6.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

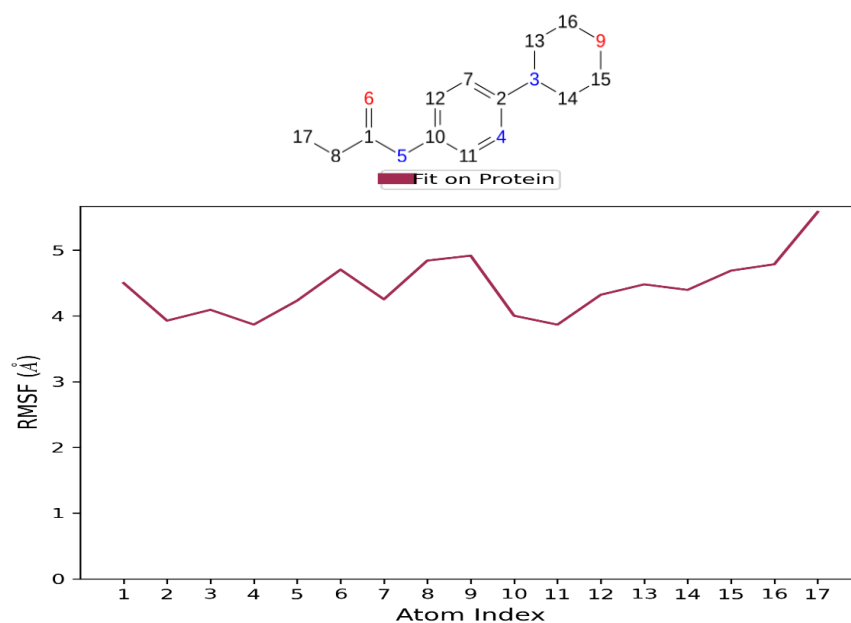


Рисунок А.6.7 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда ZE09-1182

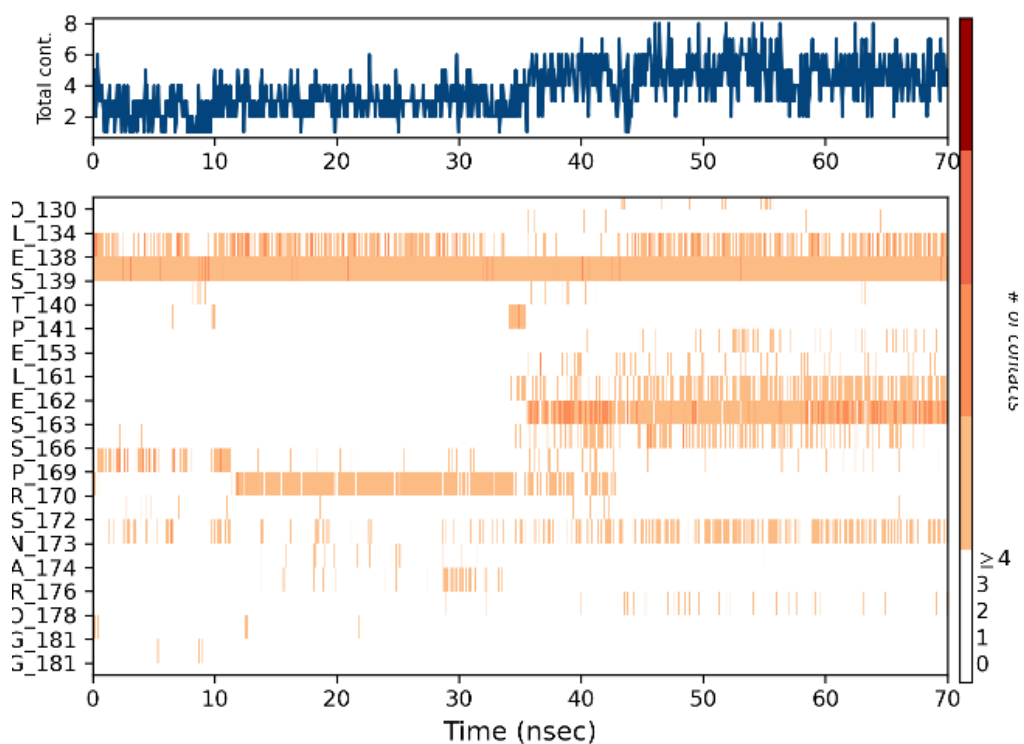


Рисунок А.6.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения А

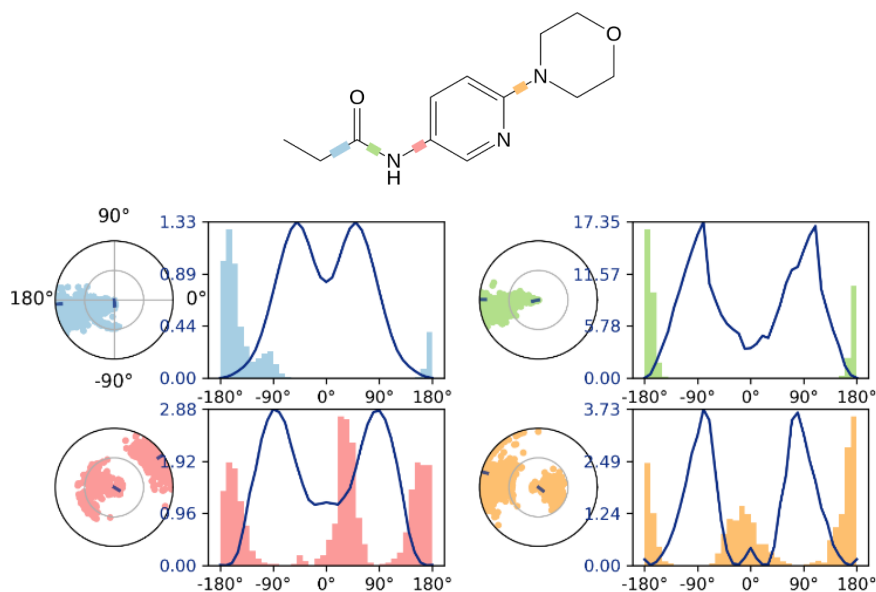


Рисунок А.6.9 – Конформационный профиль ZE09-1182

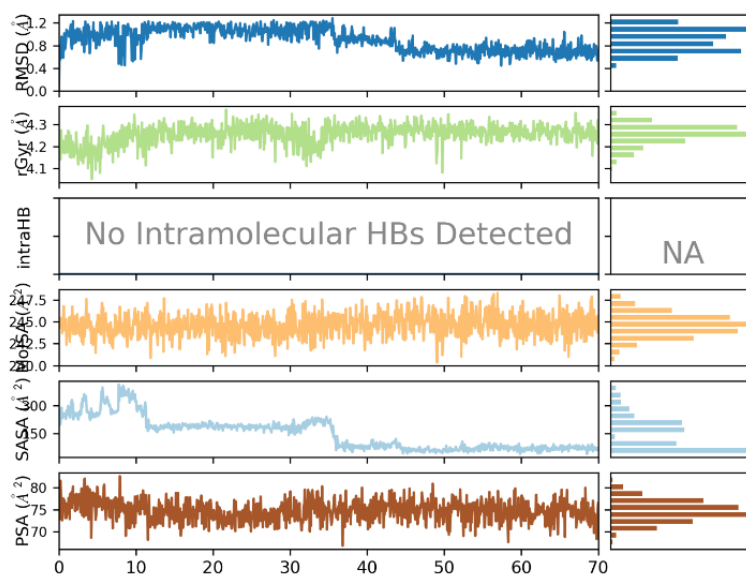


Рисунок А.6.10 – Свойства лиганда ZE09-1182

Отчет А.7. Молекулярно-динамическая симуляция соединения ZE09-1290

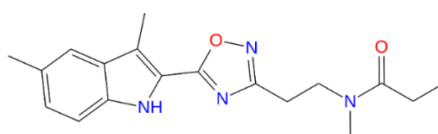


Рисунок А.7.1 – Структура лиганда ZE09-1290

Продолжение Приложения А

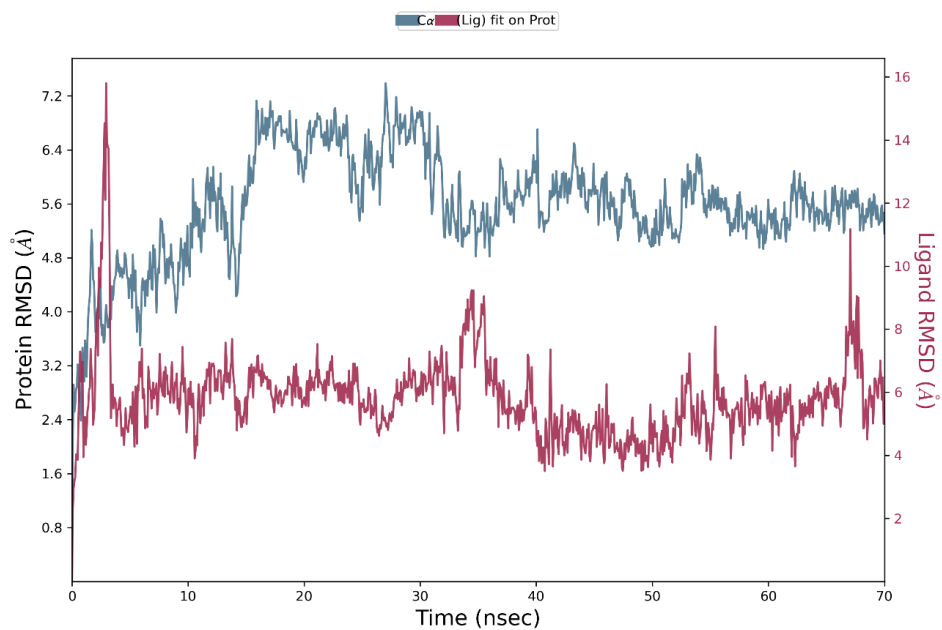


Рисунок А.7.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

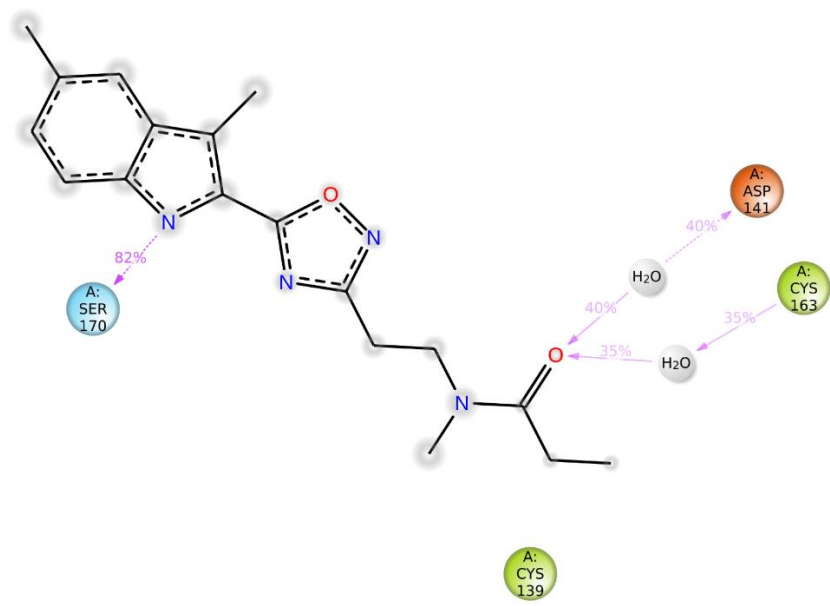


Рисунок А.7.3 – Детальное взаимодействие атомов ZE09-1290 с остатками белка

Продолжение Приложения А

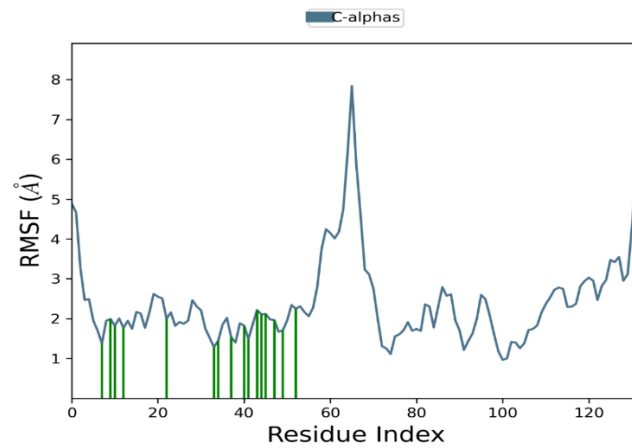


Рисунок А.7.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

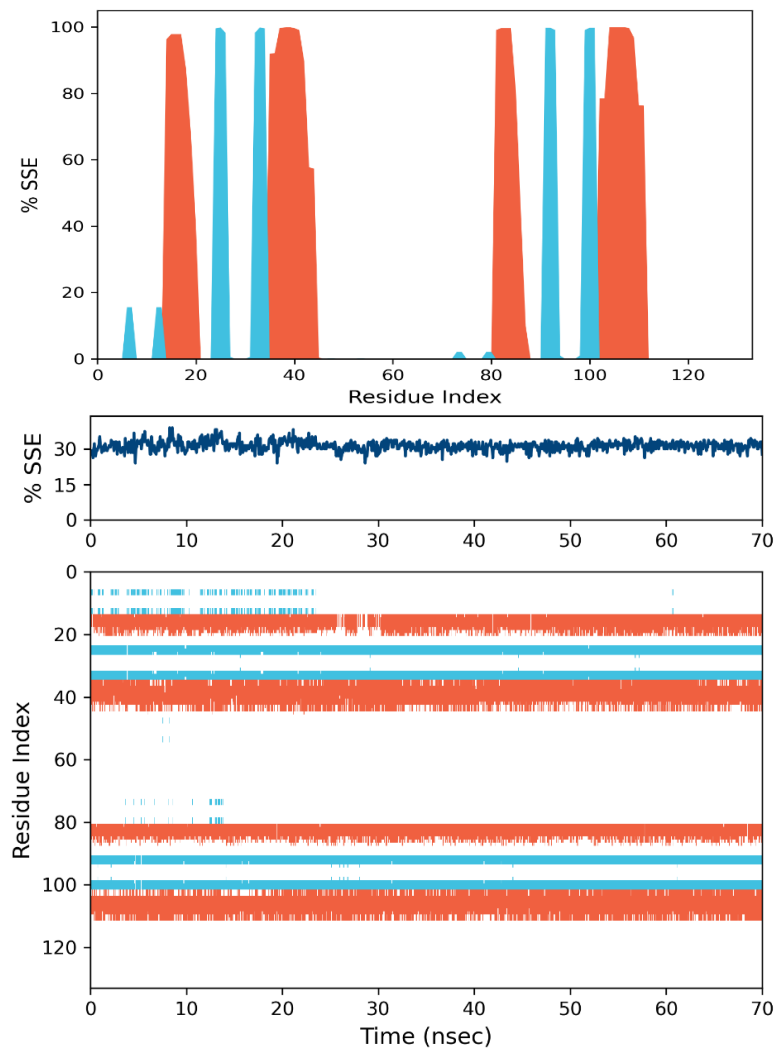


Рисунок А.7.5 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

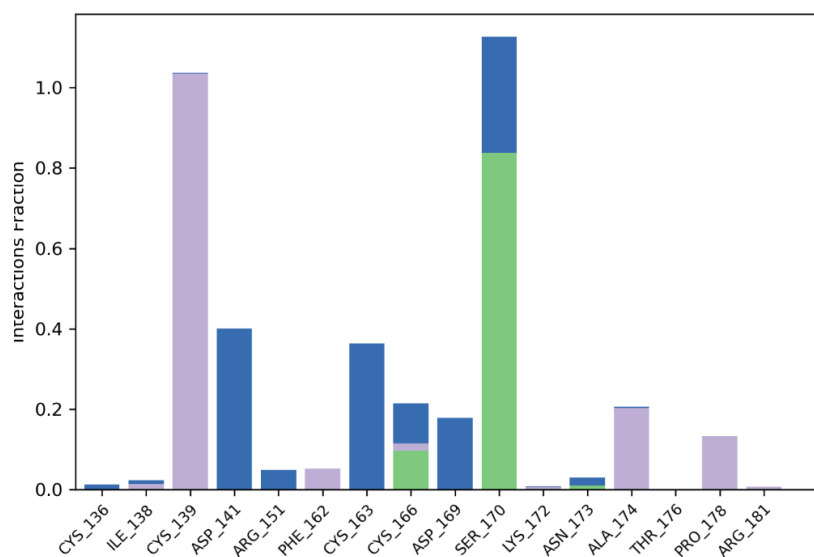


Рисунок А.7.6 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом ZE09-1290

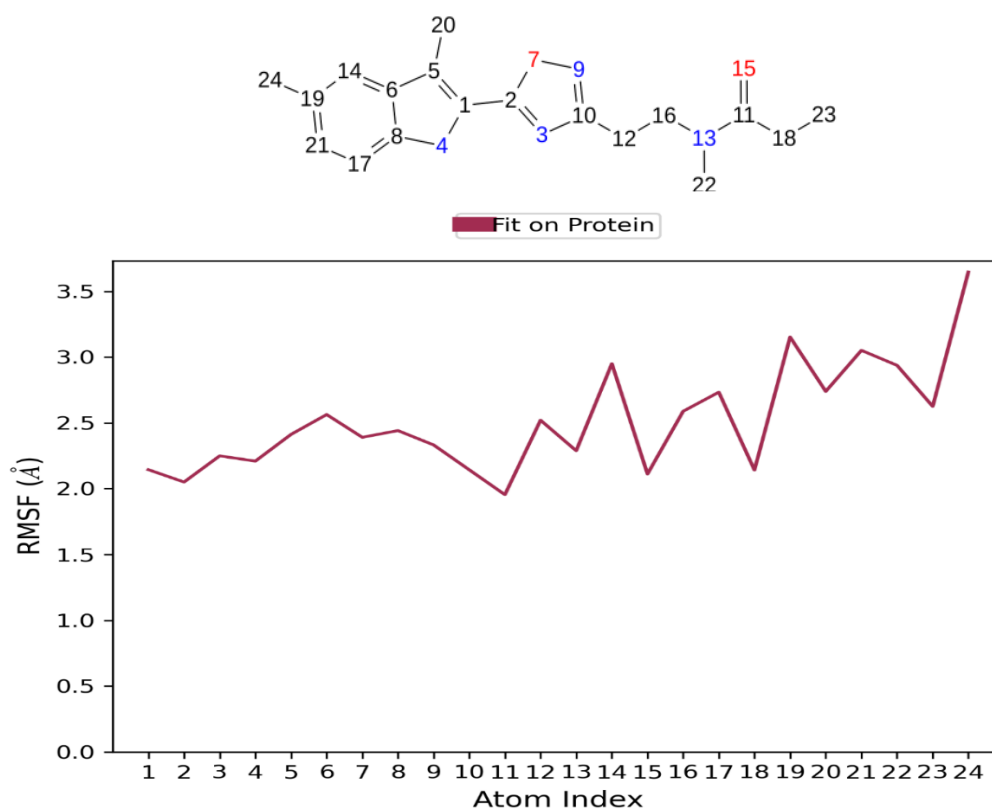


Рисунок А.7.7 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда ZE09-1290

Продолжение Приложения А

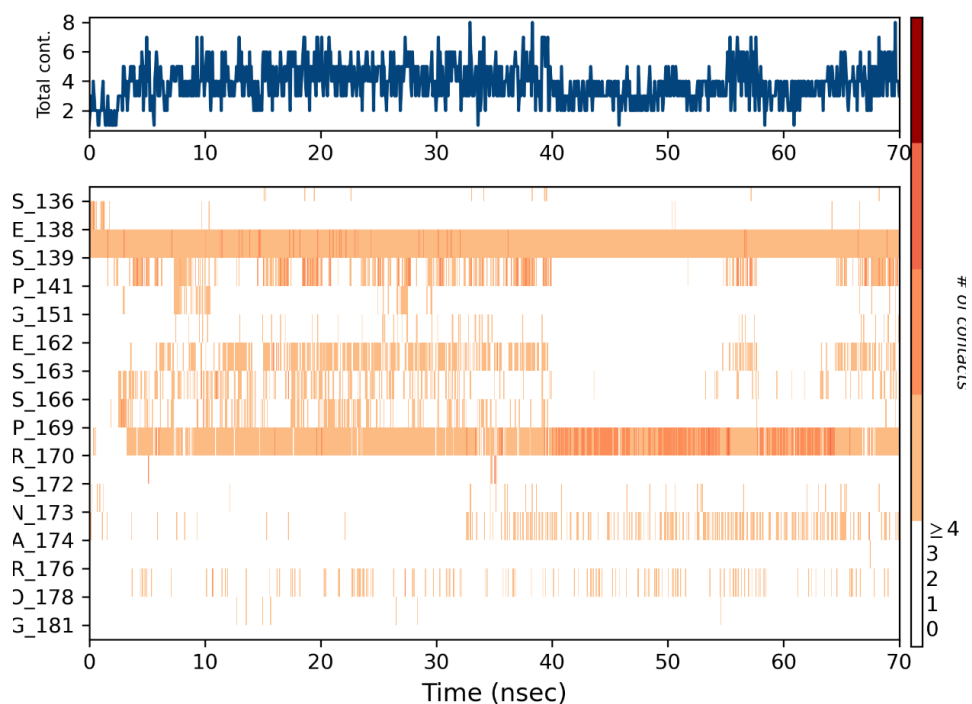


Рисунок А.7.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

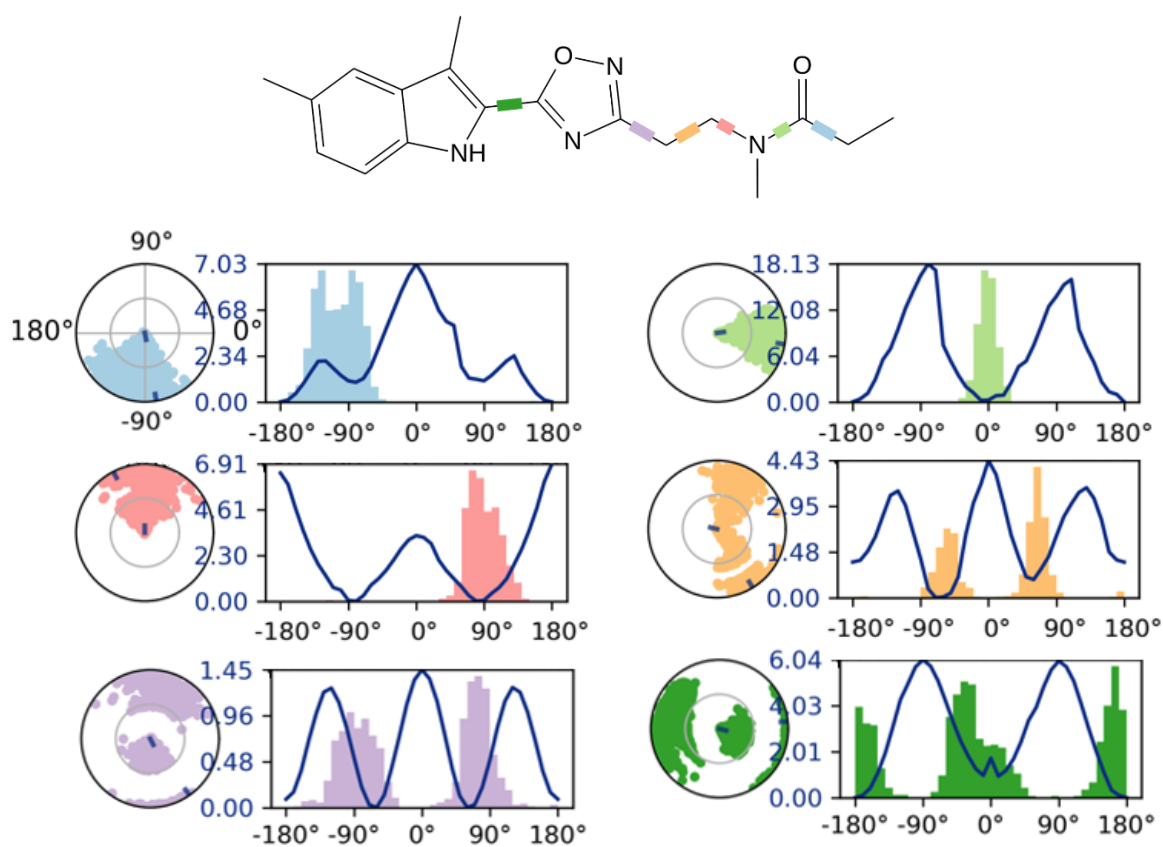


Рисунок А.7.9 – Конформационный профиль ZE09-1290

Продолжение Приложения А

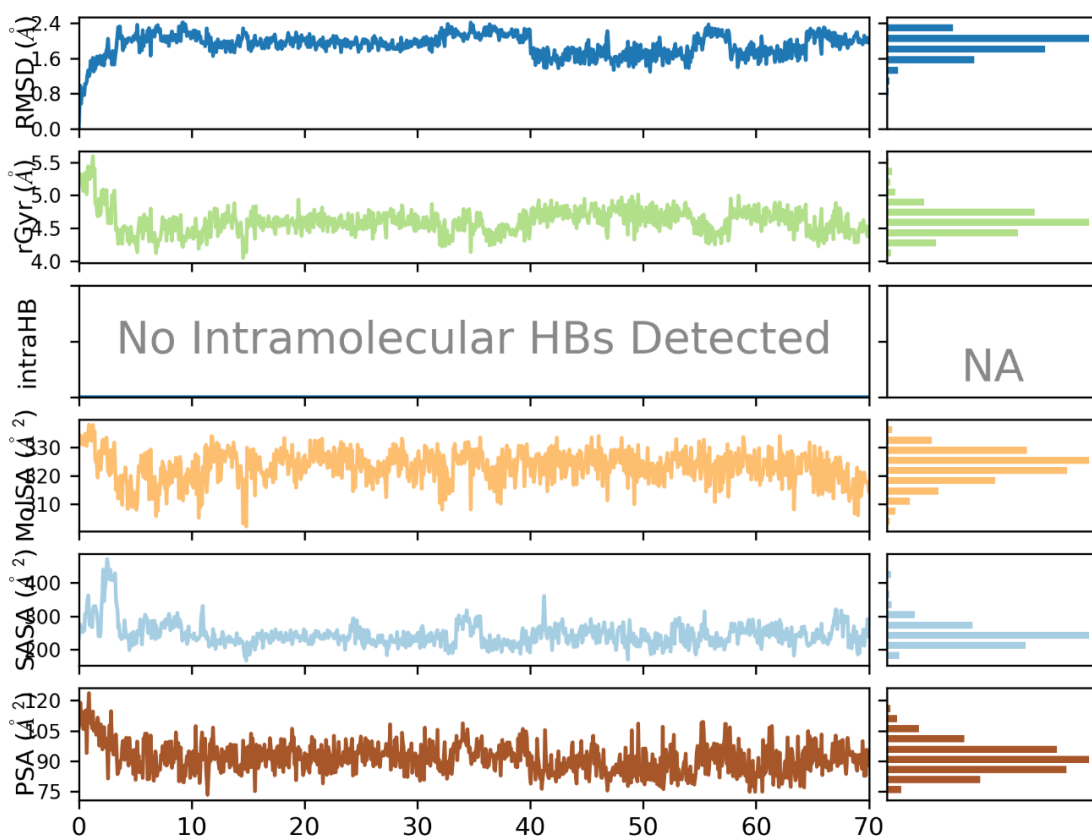


Рисунок А.7.10 – Свойства лиганда ZE09-1290

Отчет А.8. Молекулярно-динамическая симуляция соединения ZE09-0733

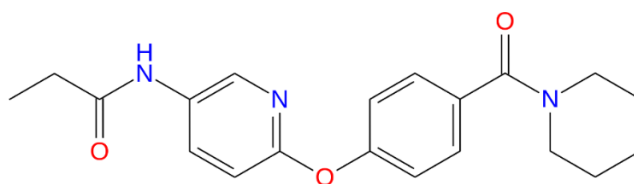


Рисунок А.8.1 – Структура лиганда ZE09-0733

Продолжение Приложения А

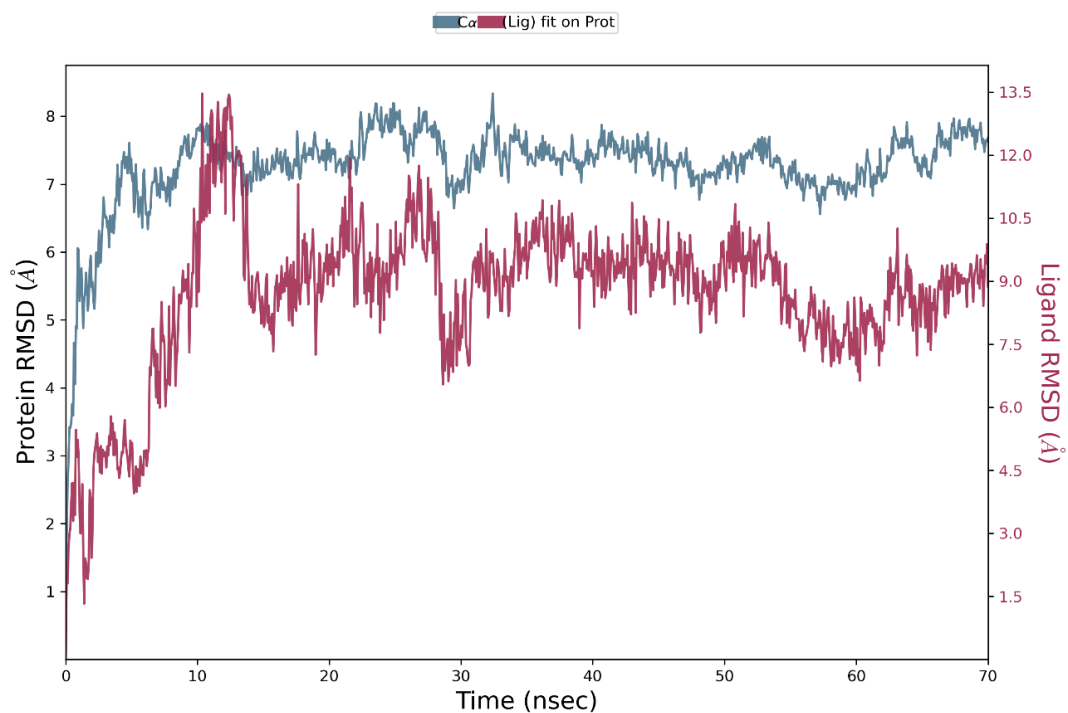


Рисунок А.8.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

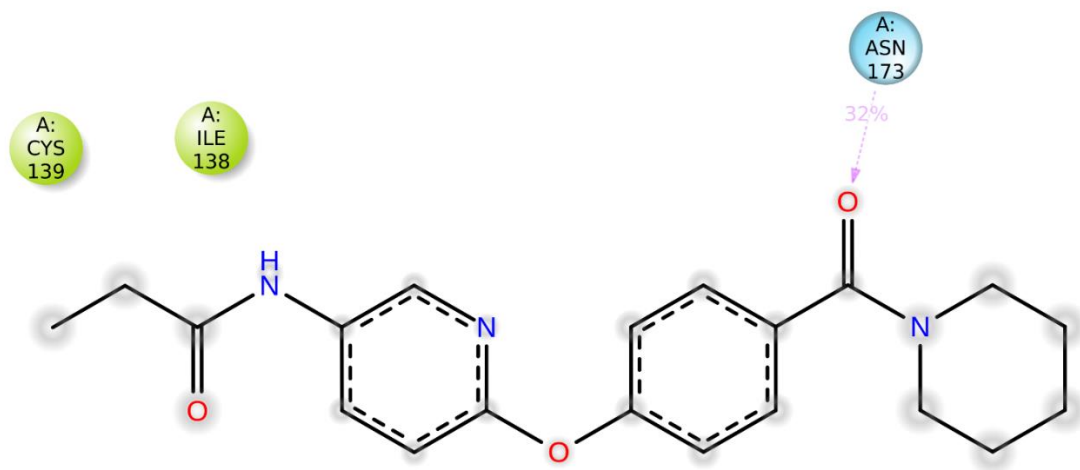


Рисунок А.8.3 – Детальное взаимодействие атомов ZE09-0733 с остатками белка

Продолжение Приложения А

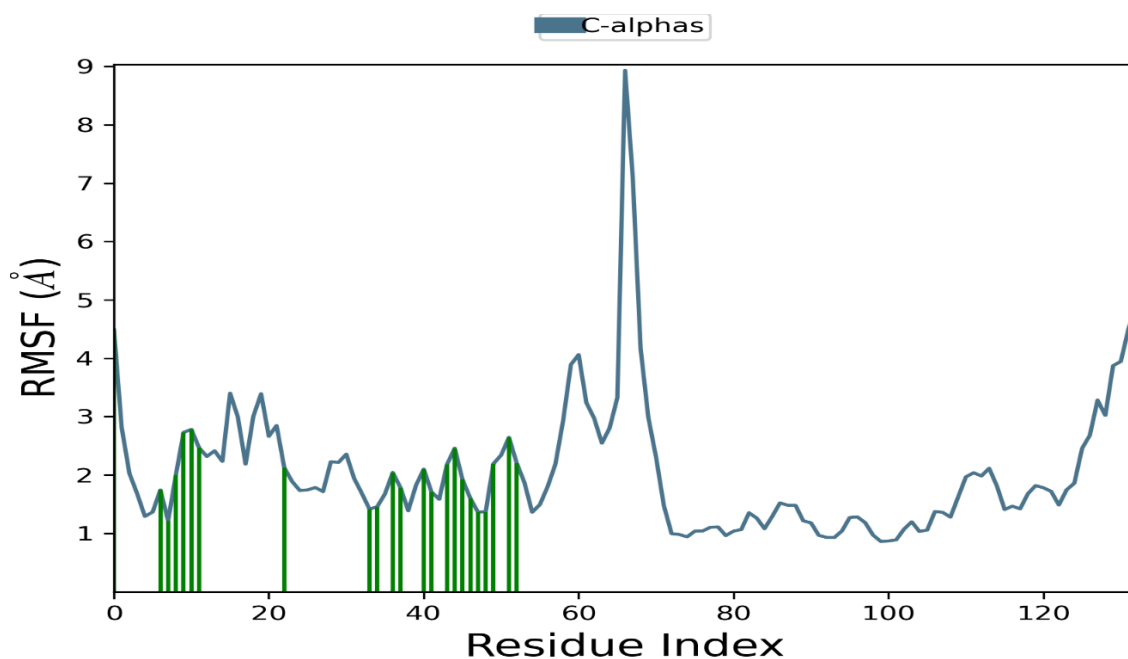


Рисунок А.8.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

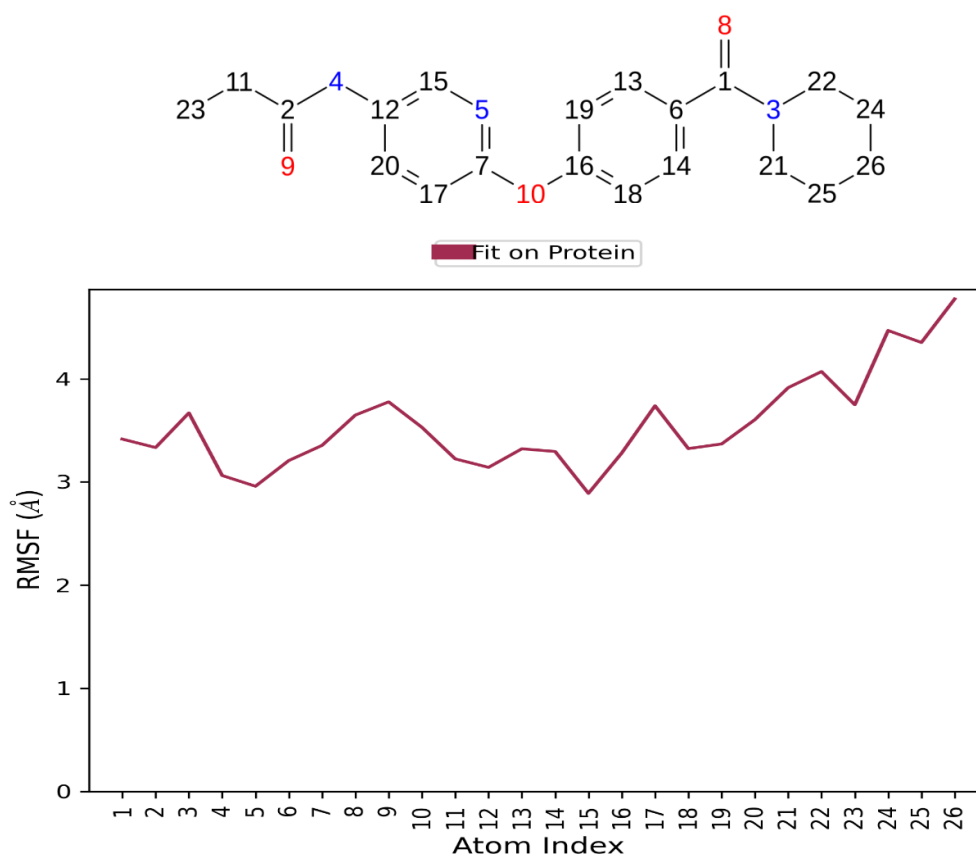


Рисунок А.8.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда ZE09-0733

Продолжение Приложения А

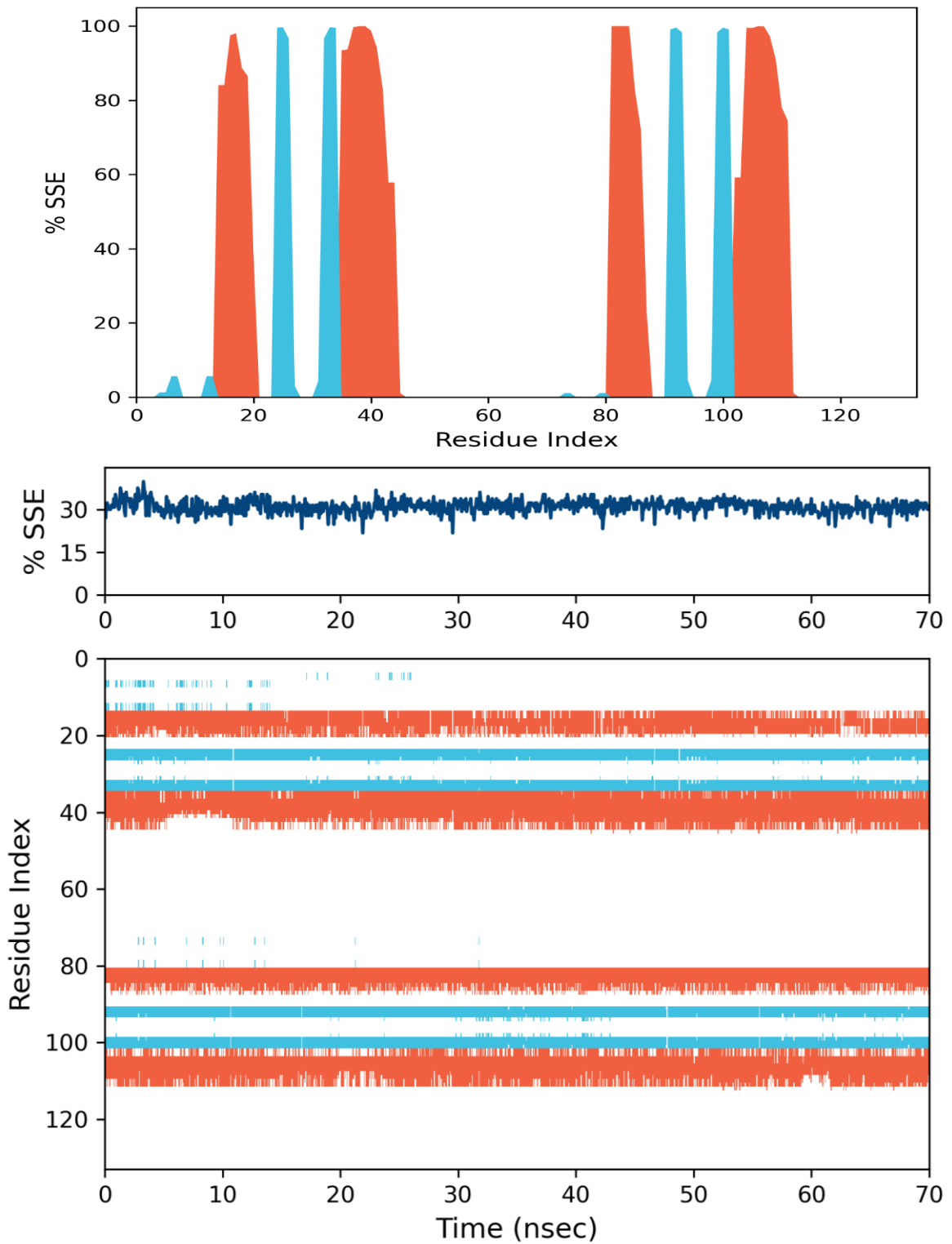


Рисунок А.8.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

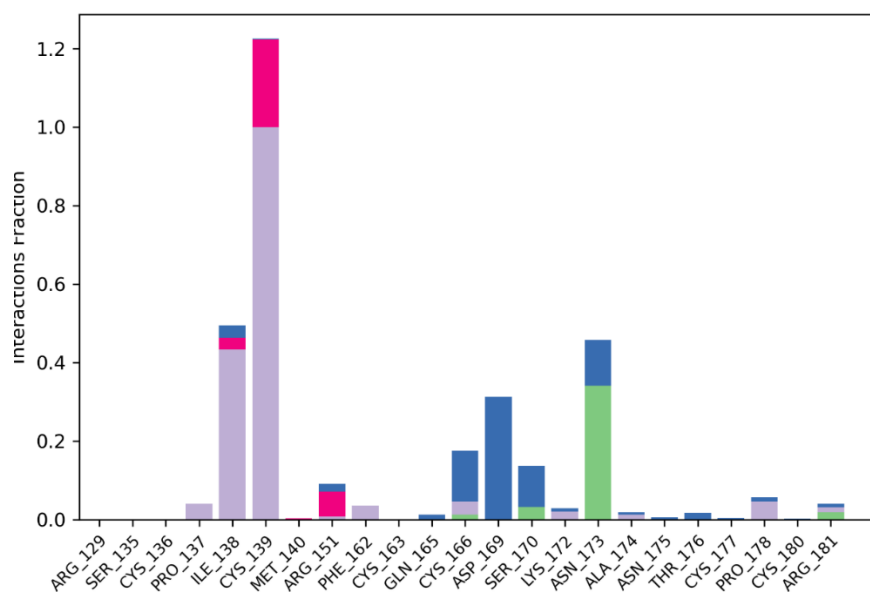


Рисунок А.8.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом ZE09-0733

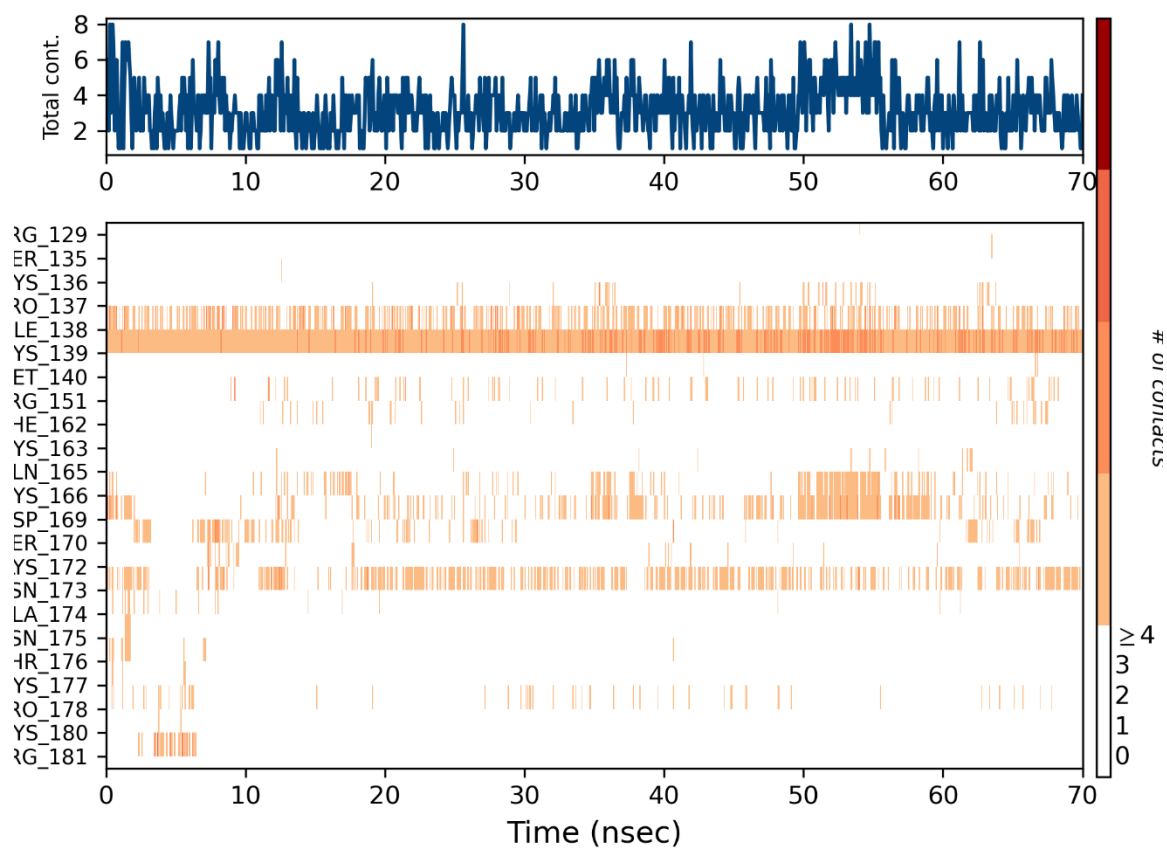


Рисунок А.8.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения А

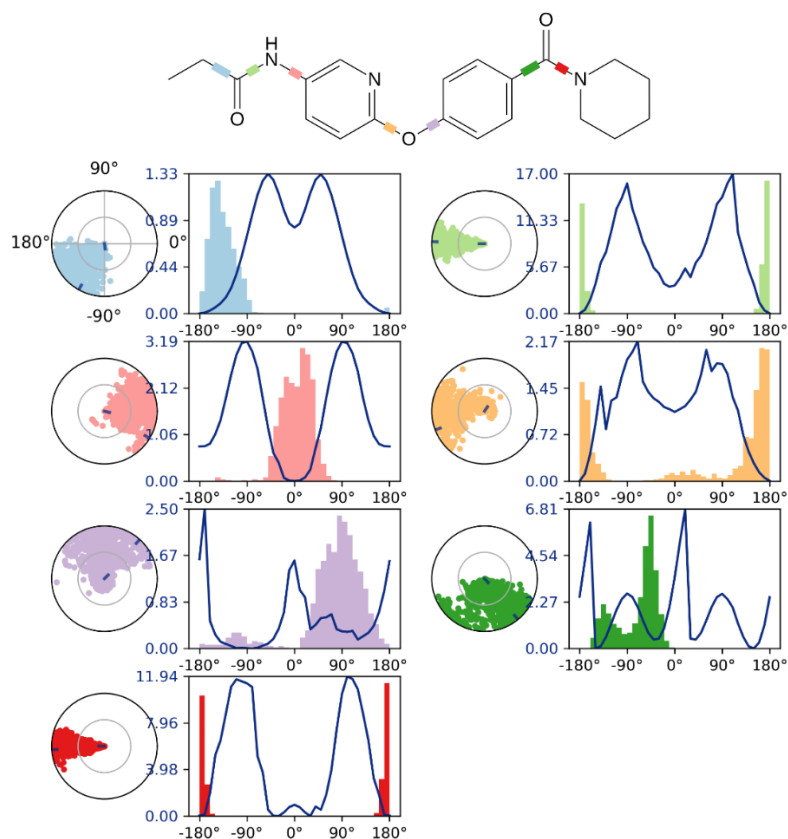


Рисунок А.8.9 – Конформационный профиль ZE09-0733

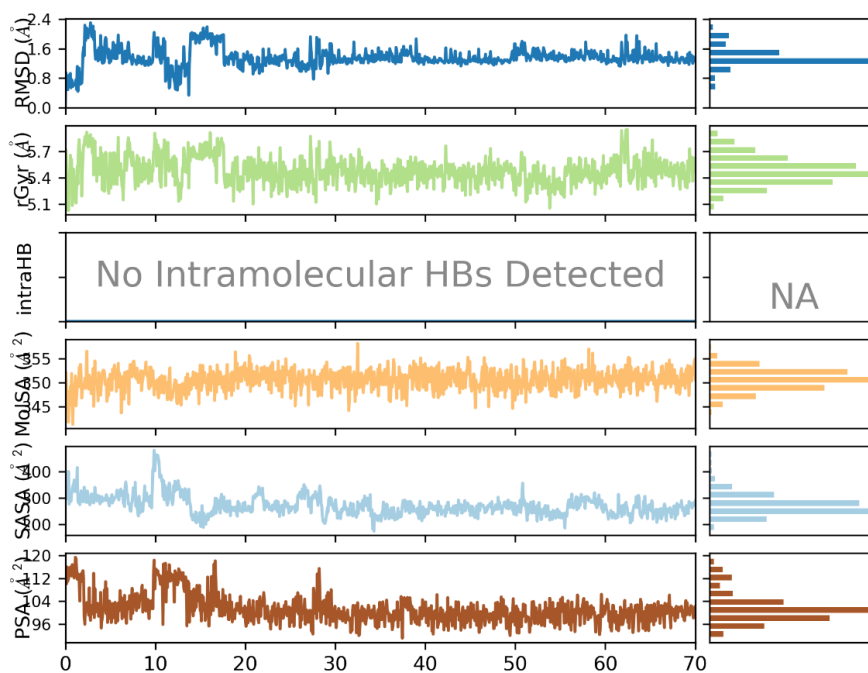


Рисунок А.8.10 – Свойства лиганда ZE09-0733

Отчет А.9. Молекулярно-динамическая симуляция соединения Т001-1599

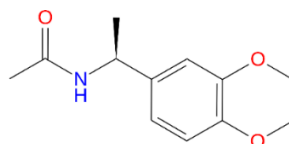


Рисунок А.9.1 – Структура лиганда Т001-1599

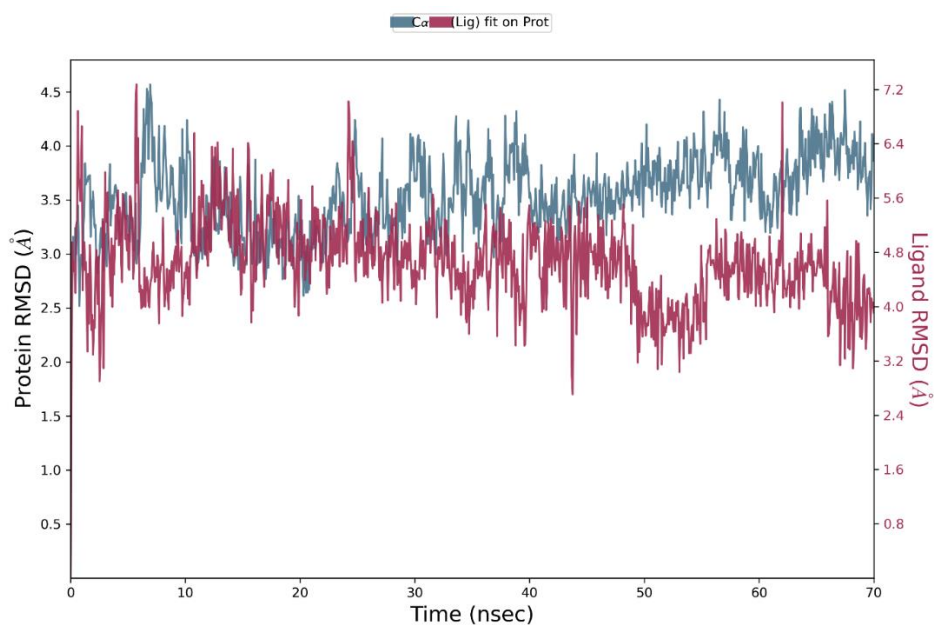


Рисунок А.9.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

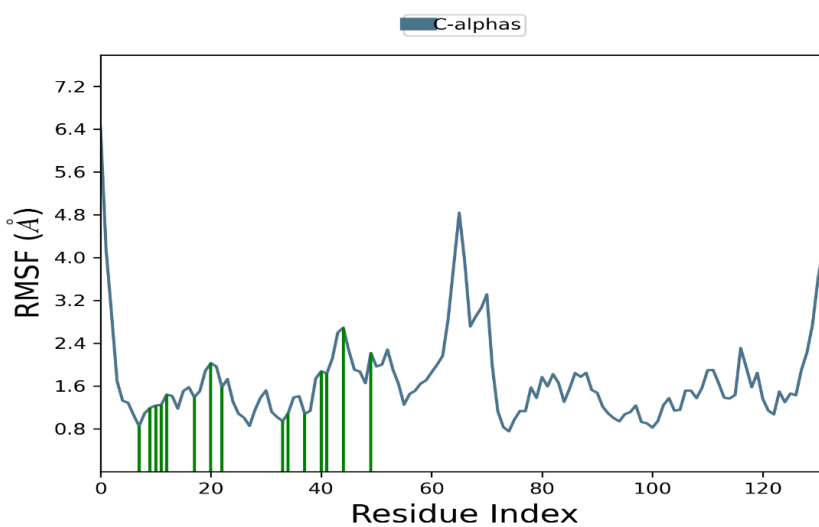


Рисунок А.9.3 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

Продолжение Приложения А

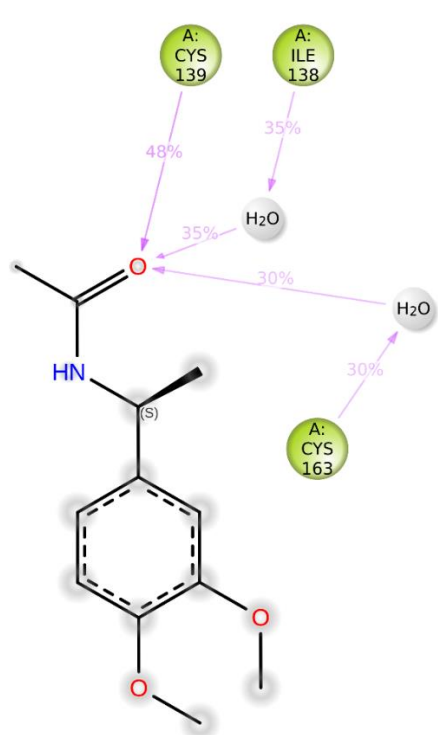


Рисунок А.9.4 – Детальное взаимодействие атомов T001-1599 с остатками белка

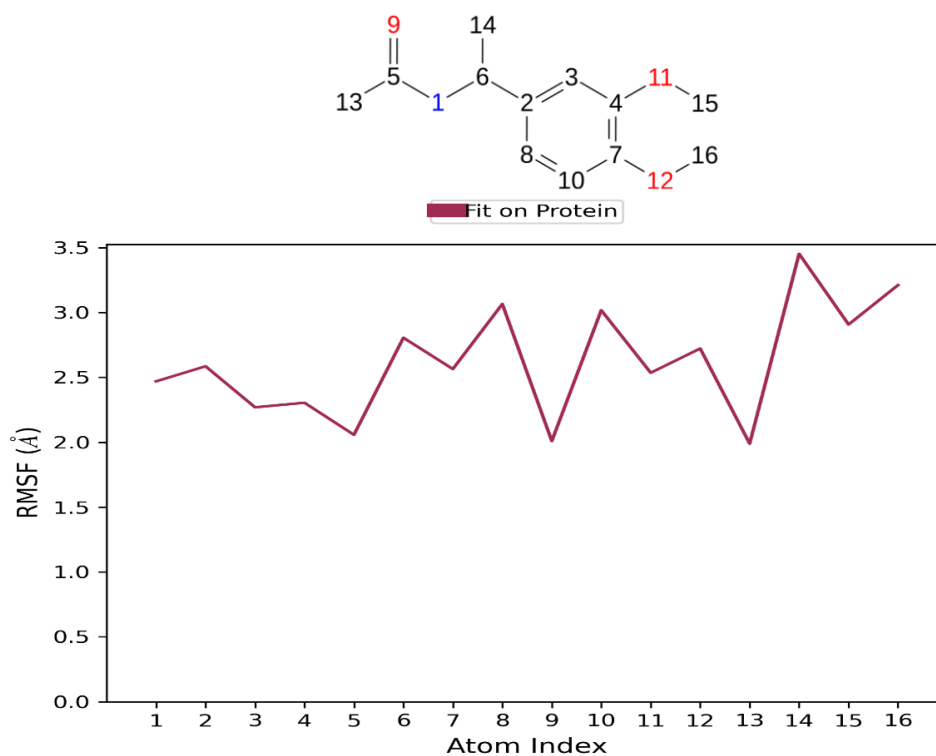


Рисунок А.9.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда T001-1599

Продолжение Приложения А

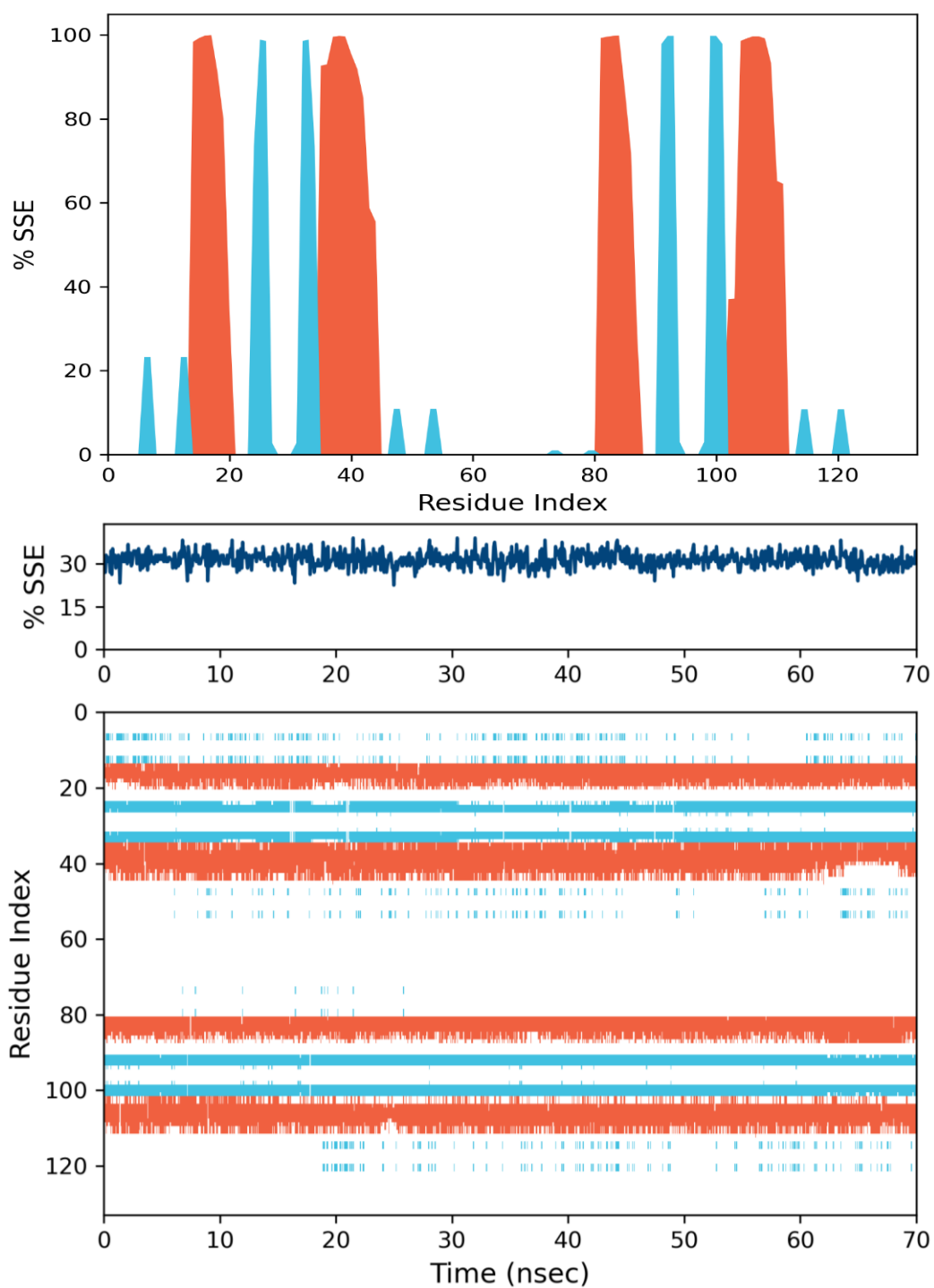


Рисунок А.9.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

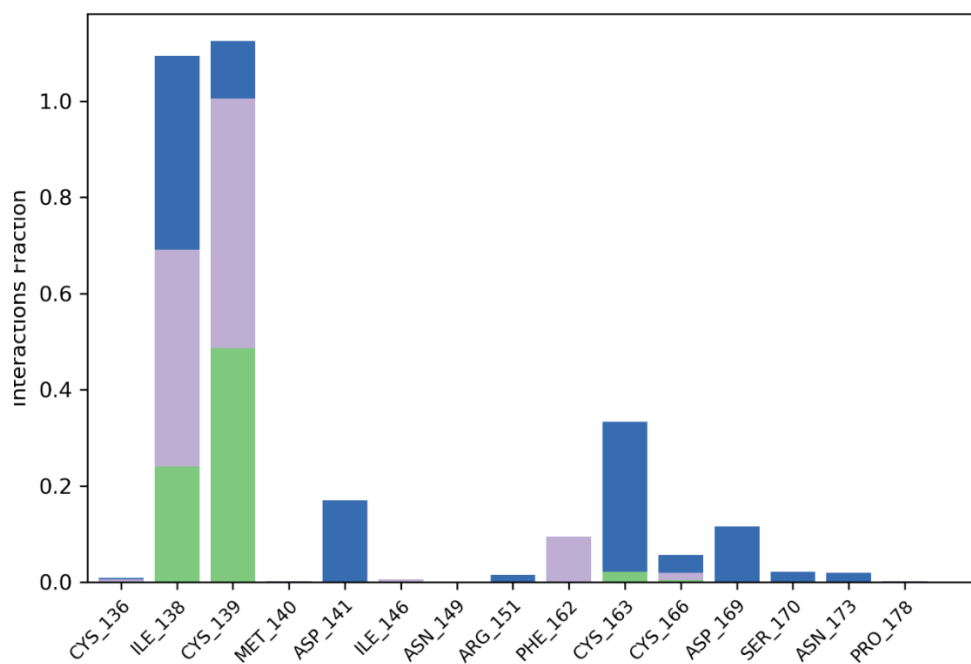


Рисунок А.9.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом T001-1599

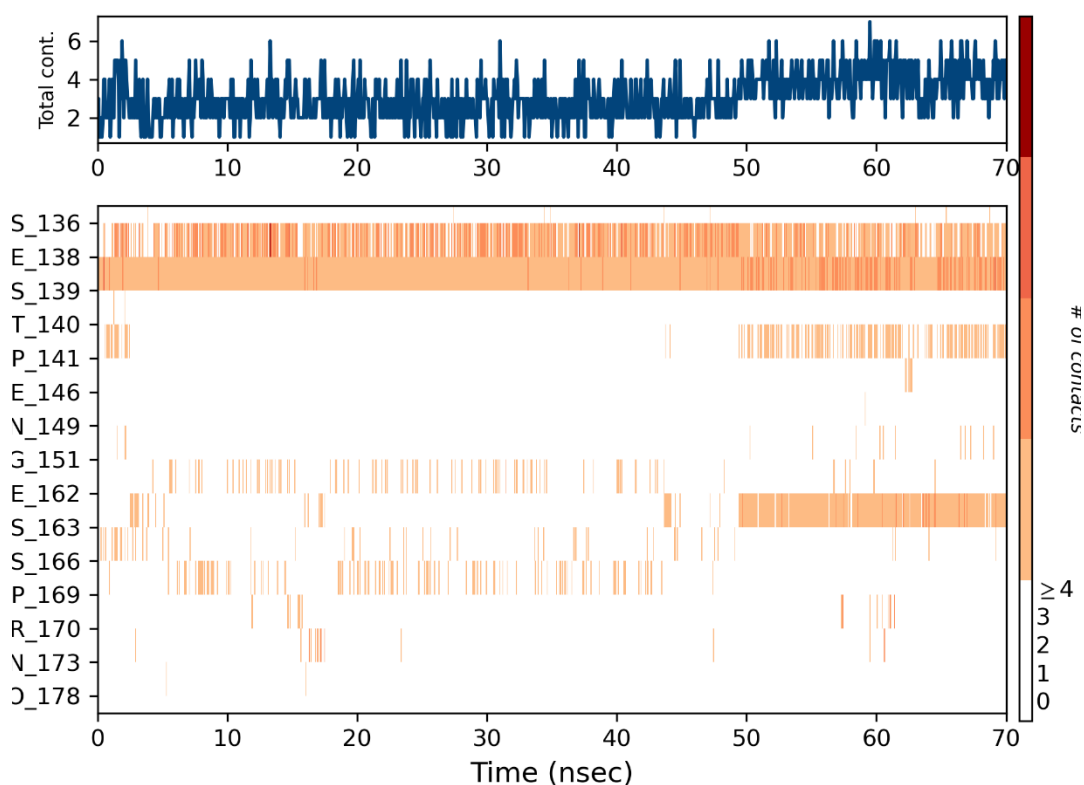


Рисунок А.9.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения А

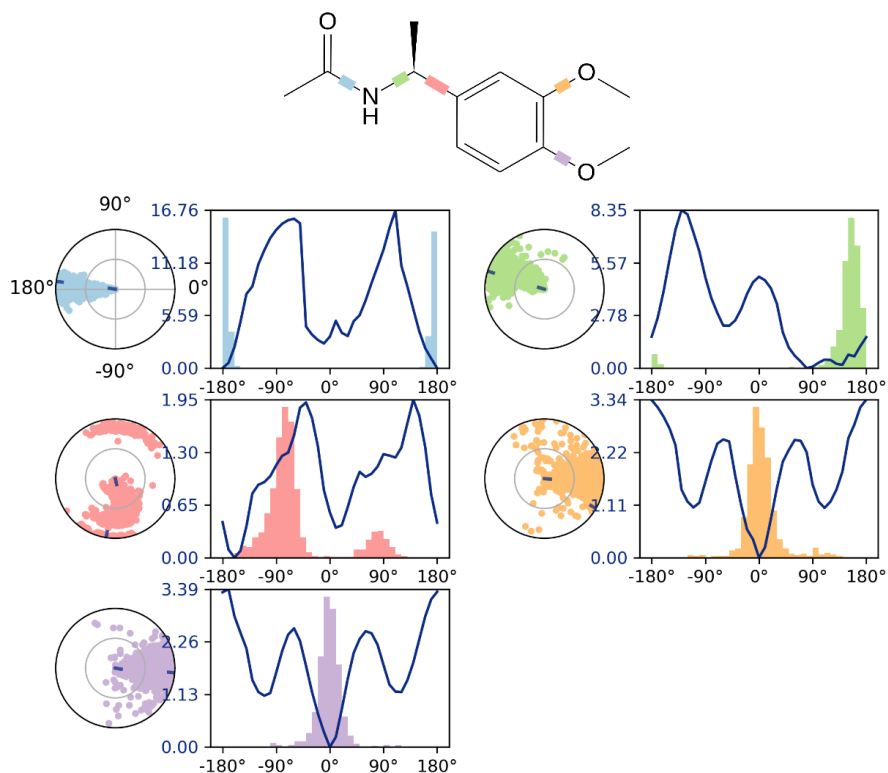


Рисунок А.9.9 – Конформационный профиль T001-1599

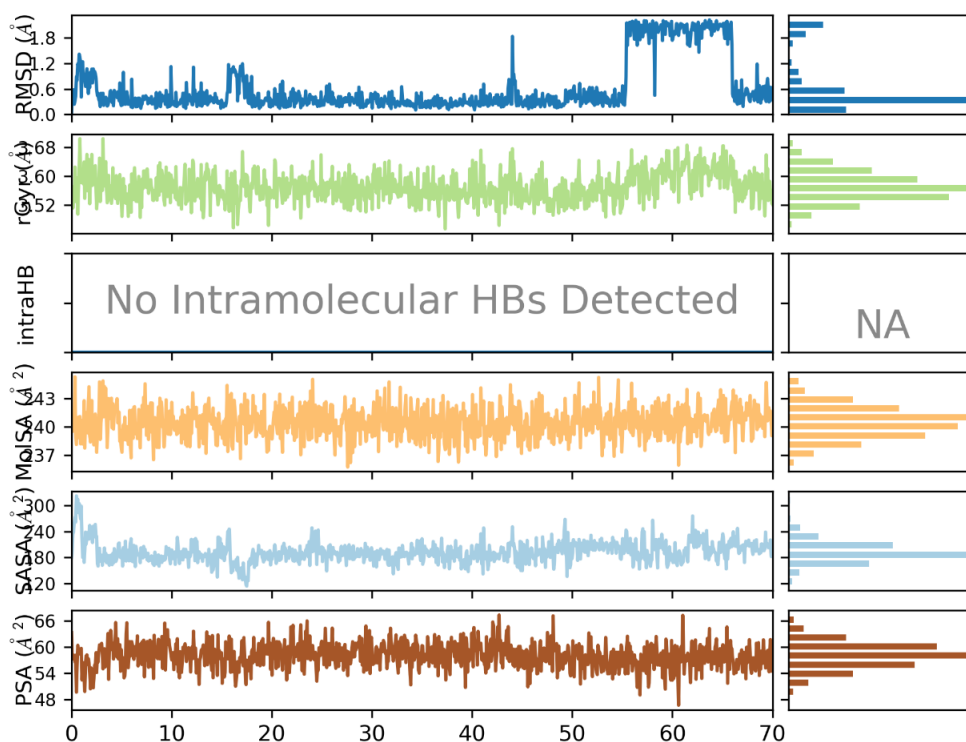


Рисунок А.9.10 – Свойства лиганда T001-1599

Продолжение Приложения А

Отчет А.10. Молекулярно-динамическая симуляция соединения Т001-0450

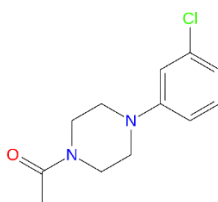


Рисунок А.10.1 – Структура лиганда Т001-0450

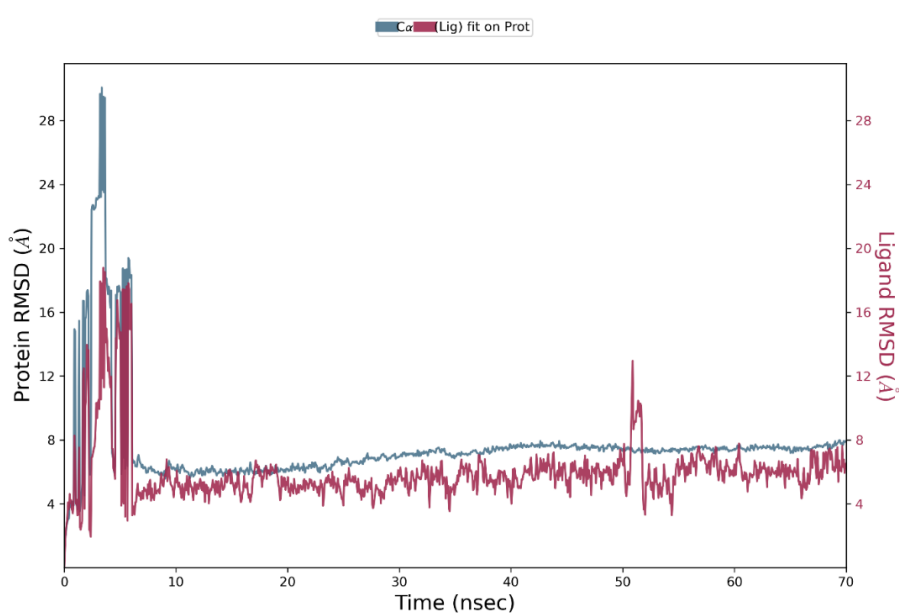


Рисунок А.10.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

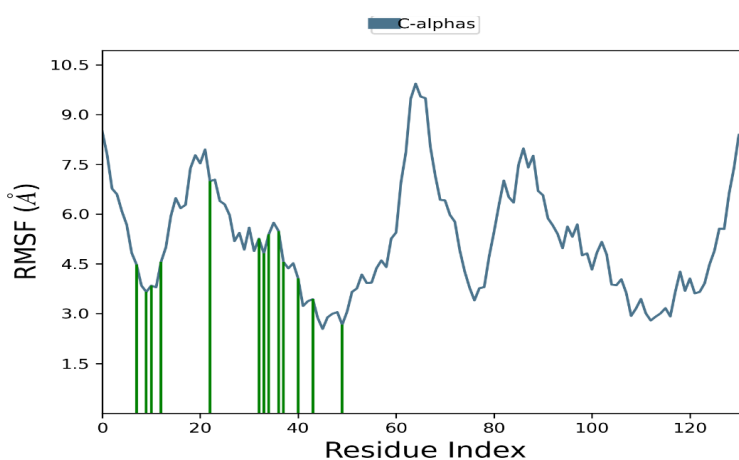


Рисунок А.10.3 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

Продолжение Приложения А

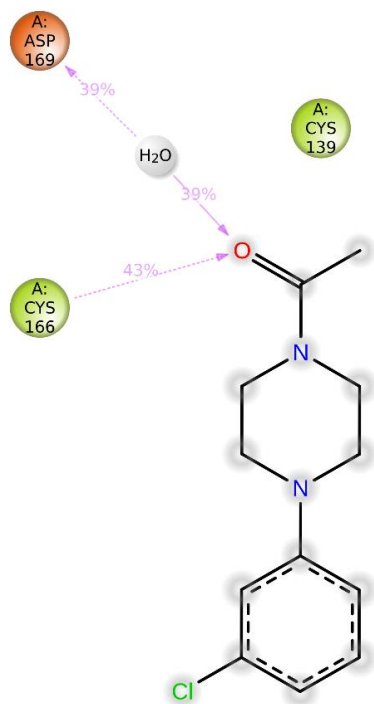


Рисунок А.10.4 – Детальное взаимодействие атомов T001-0450 с остатками белка

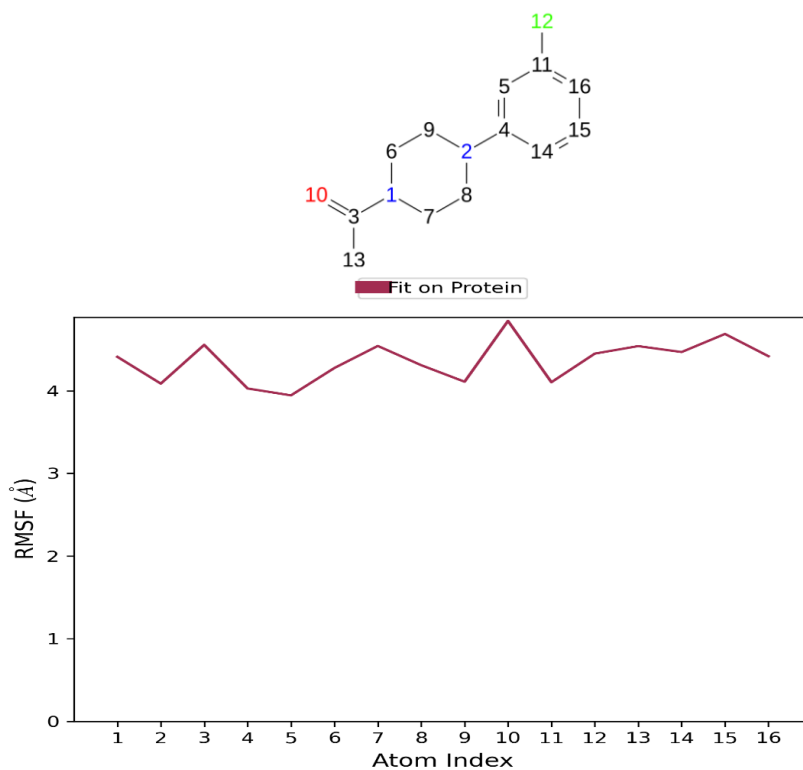


Рисунок А.10.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда T001-0450

Продолжение Приложения А

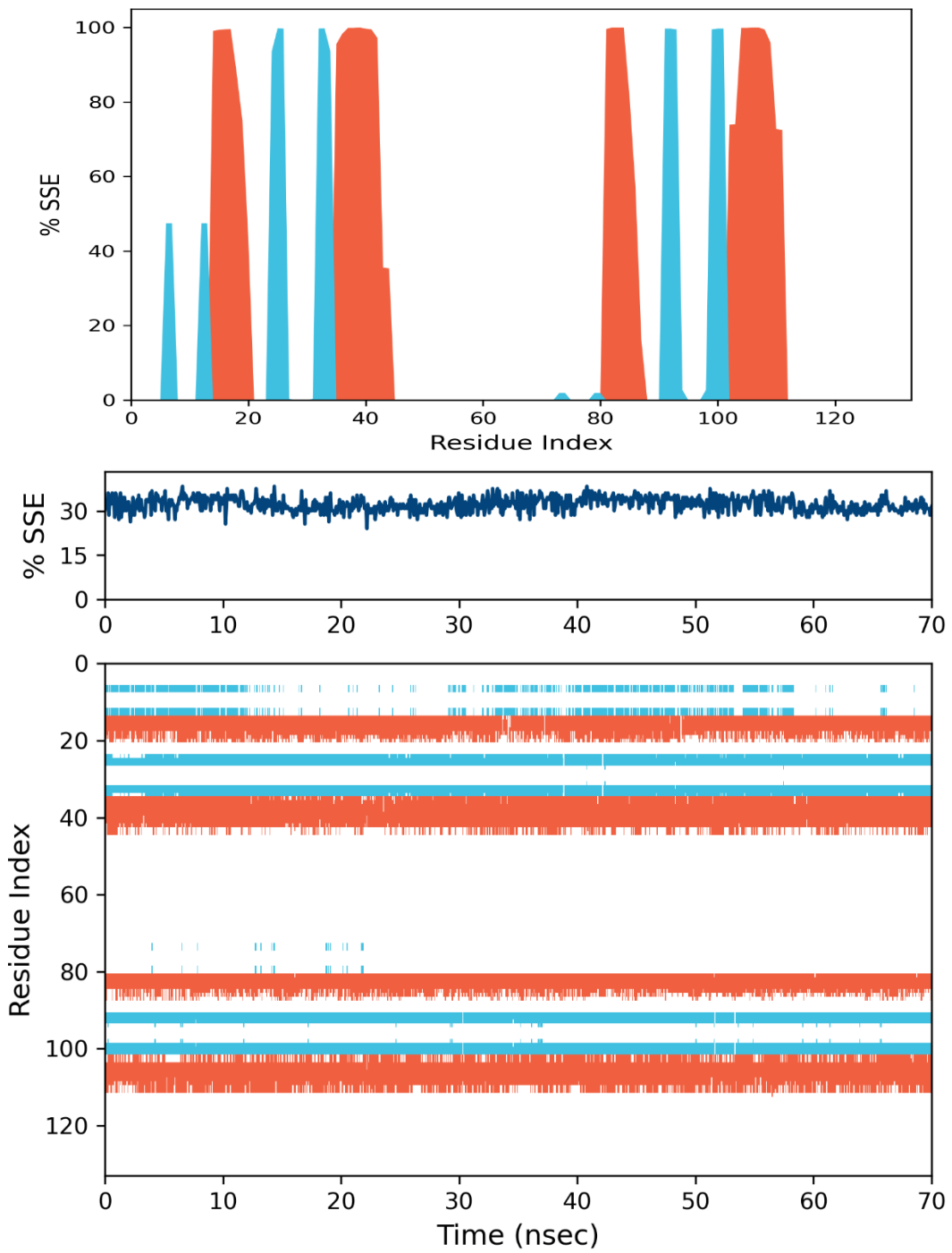


Рисунок А.10.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

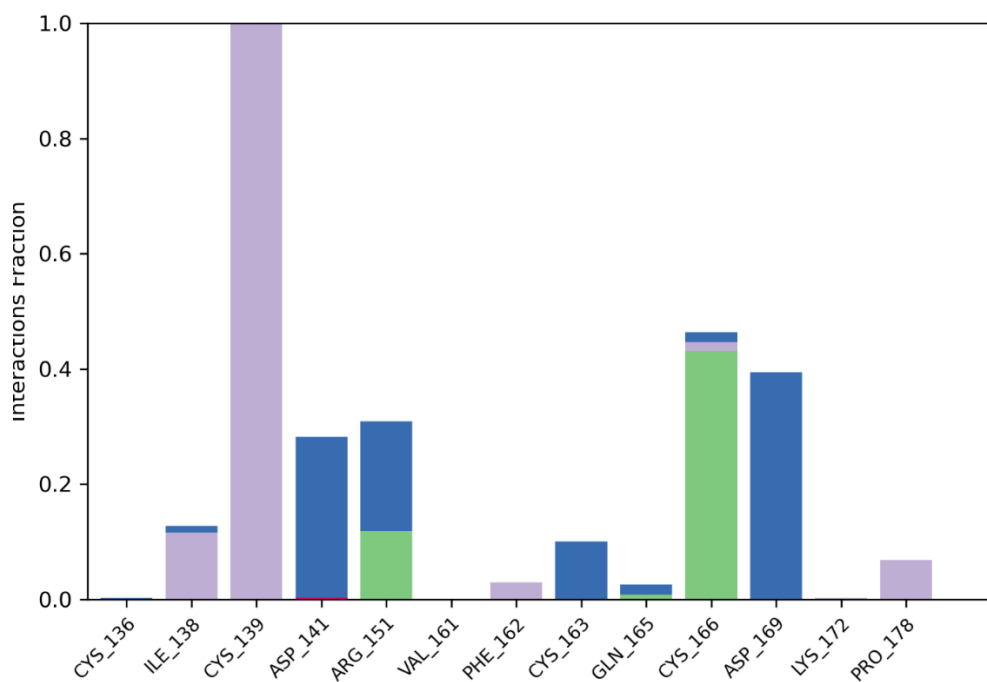


Рисунок А.10.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом T001-0450

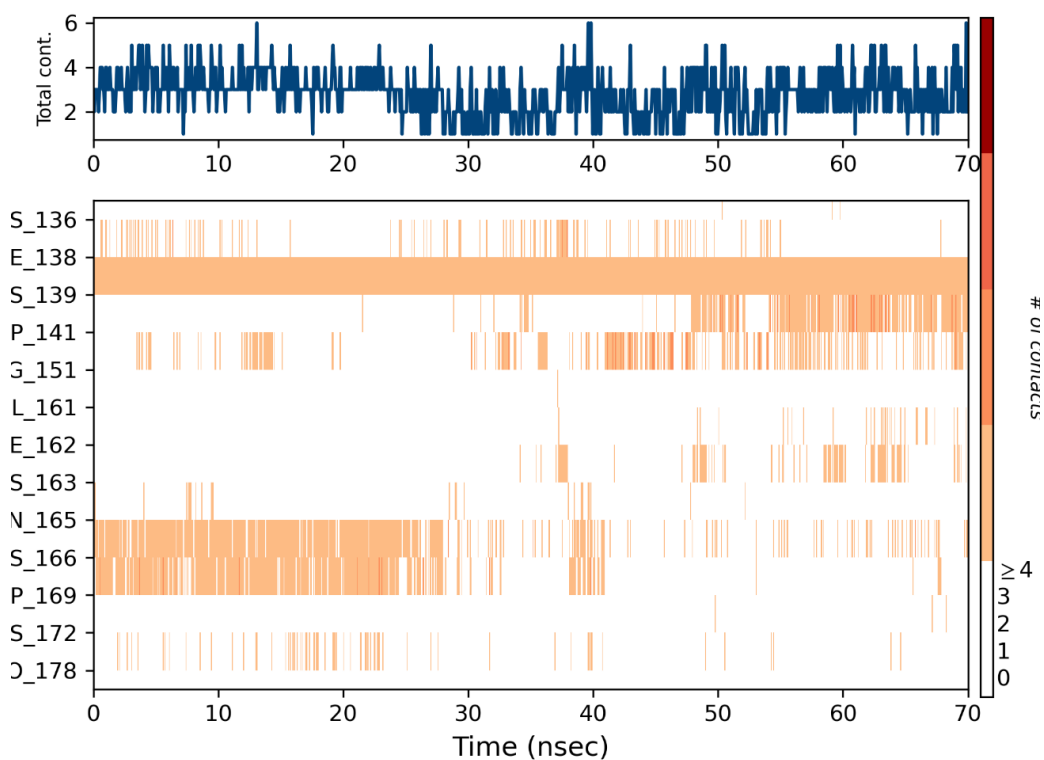


Рисунок А.10.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения А

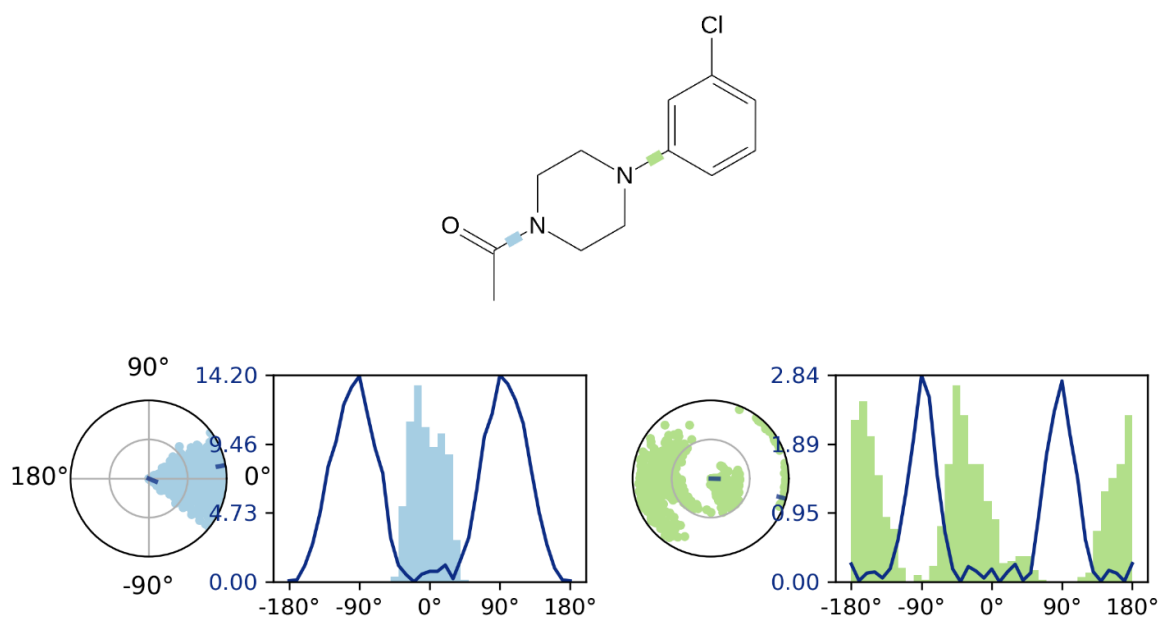


Рисунок А.10.9 – Конформационный профиль T001-0450

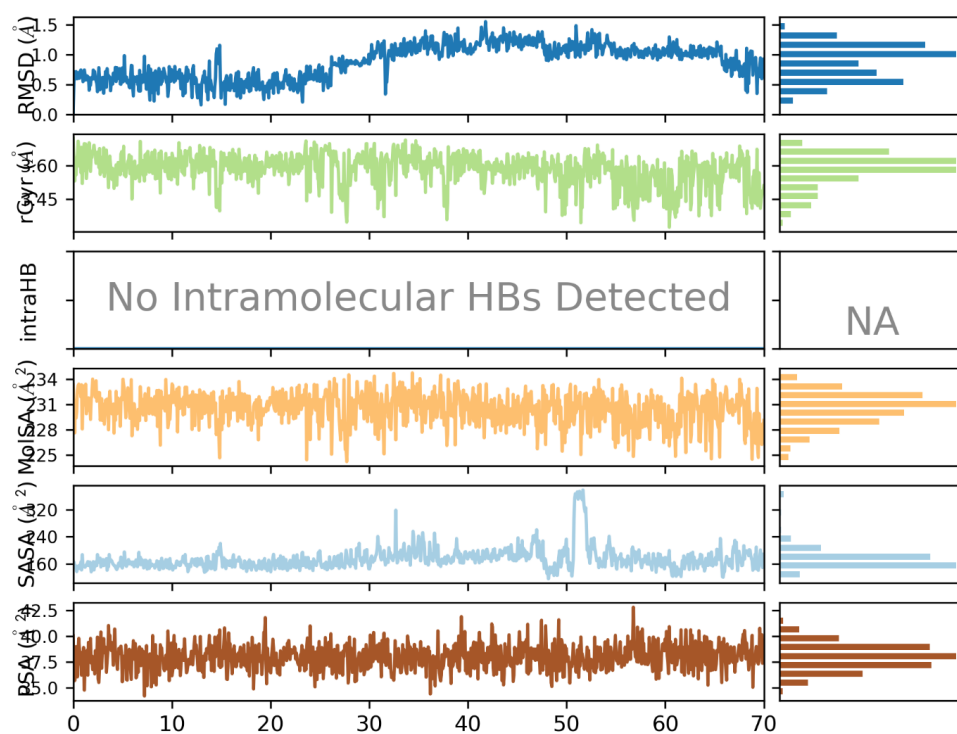


Рисунок А.10.10 – Свойства лиганда T001-0450

Продолжение Приложения А

Отчет А.11. Молекулярно-динамическая симуляция соединения 8018-6498

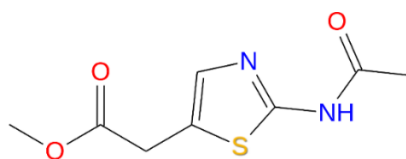


Рисунок А.11.1 – Структура лиганда 8018-6498

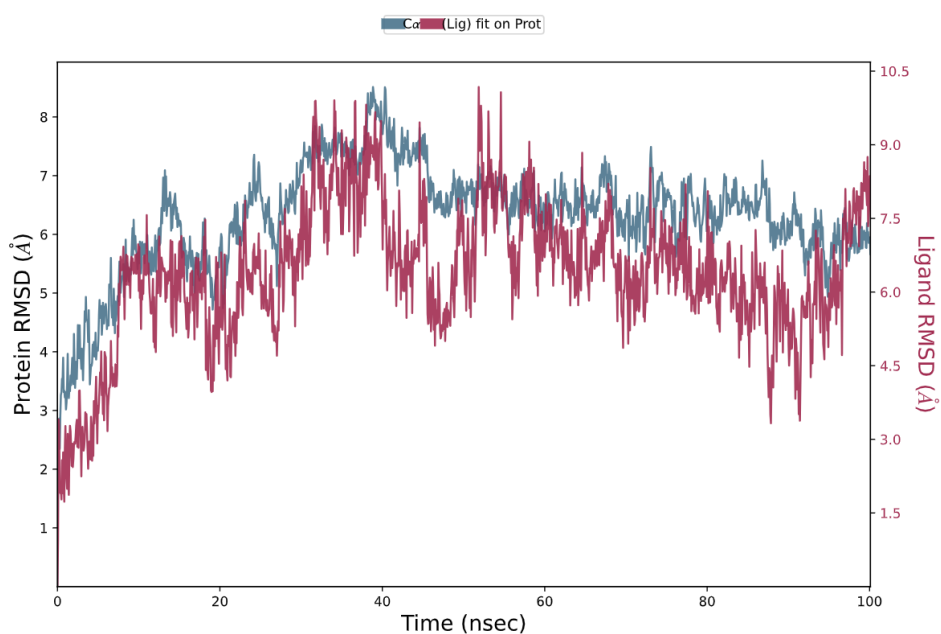


Рисунок А.11.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

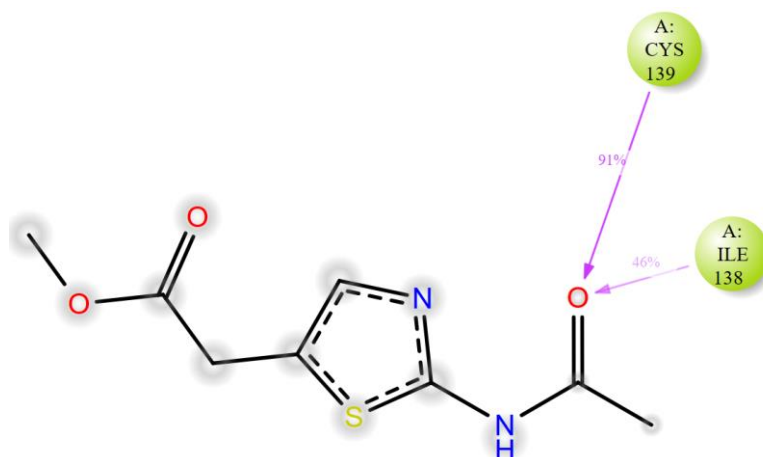


Рисунок А.11.3 – Детальное взаимодействие атомов 8018-6498 с остатками белка

Продолжение Приложения А

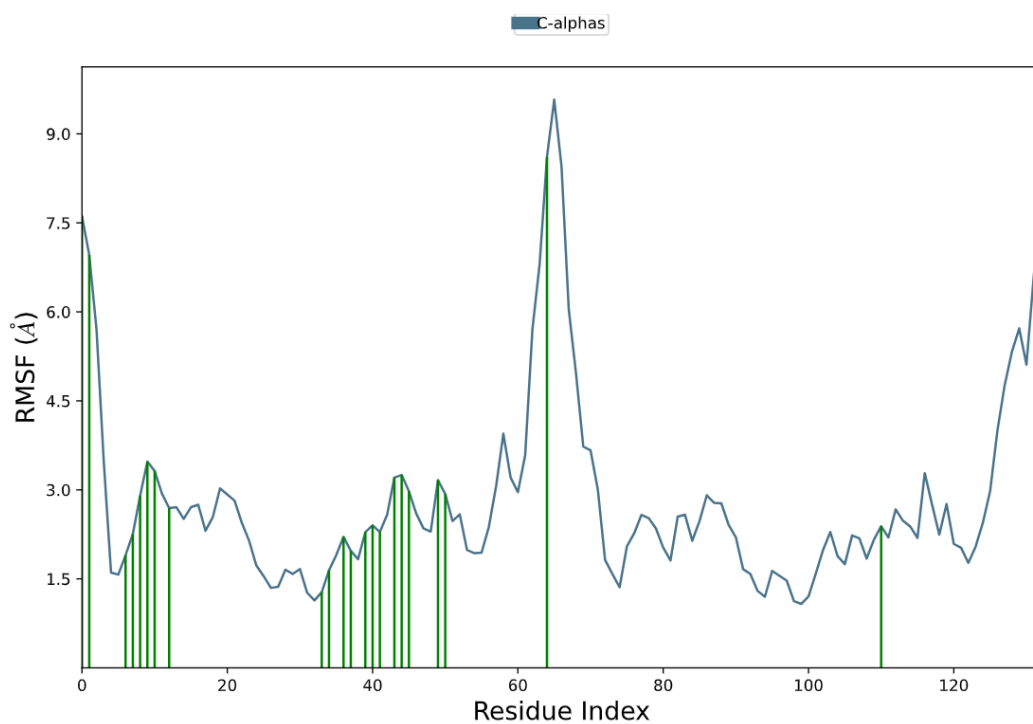


Рисунок А.11.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

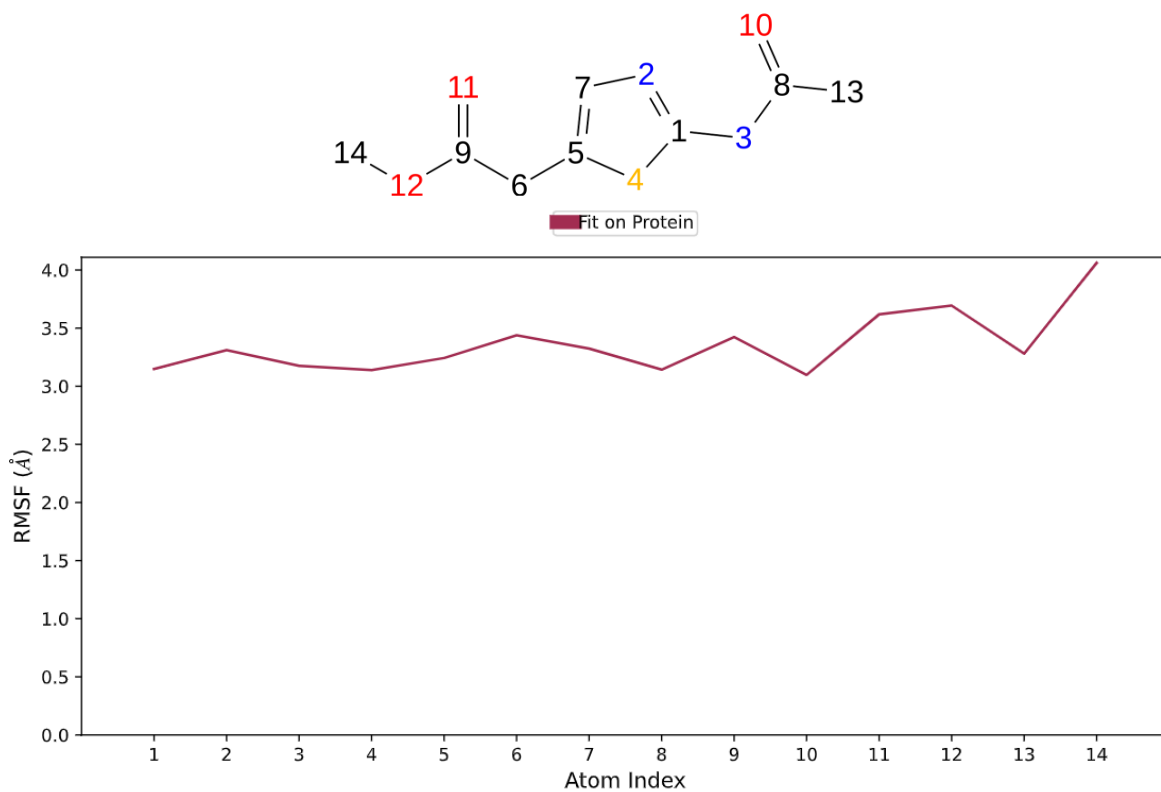


Рисунок А.11.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда 8018-6498

Продолжение Приложения А

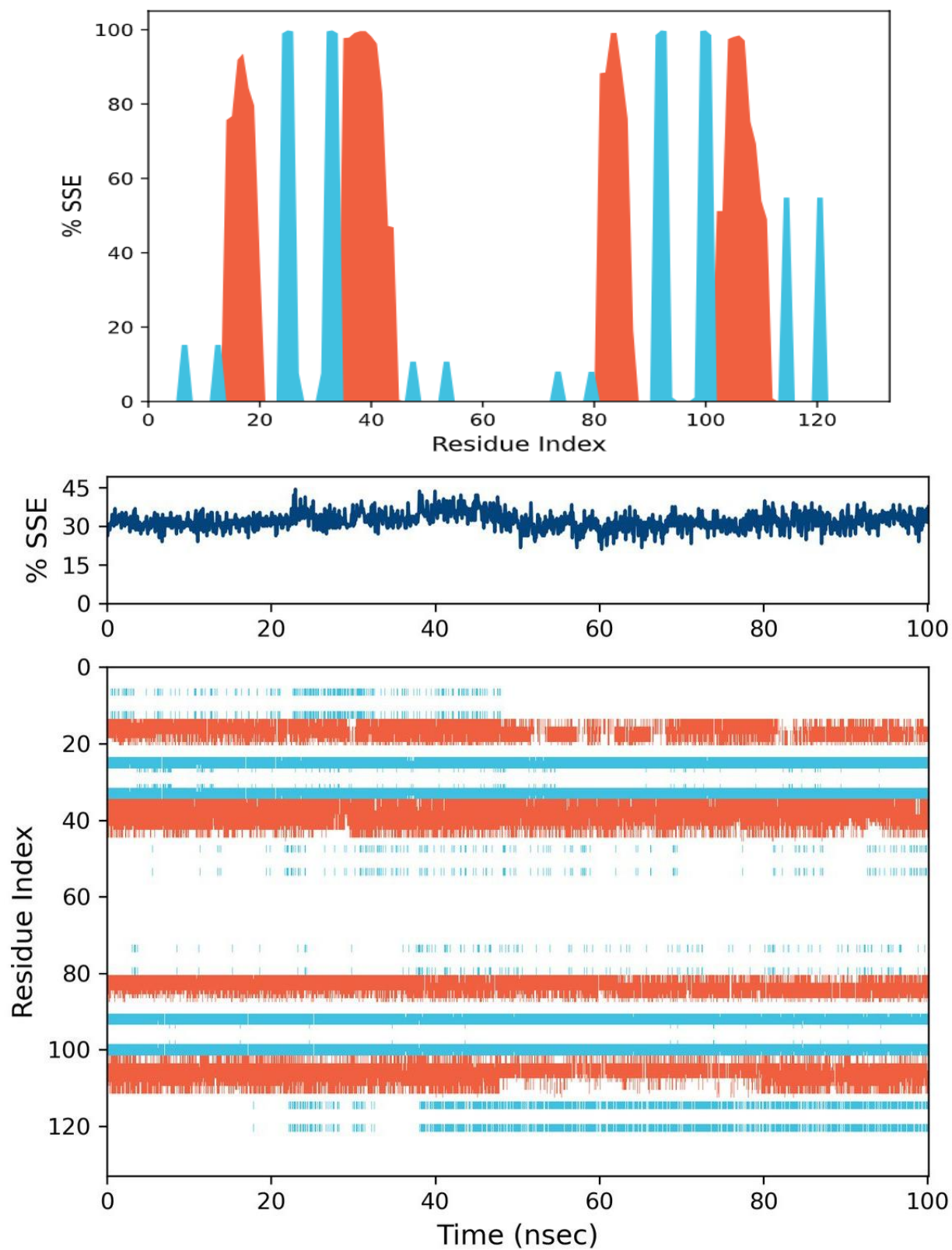


Рисунок А.11.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

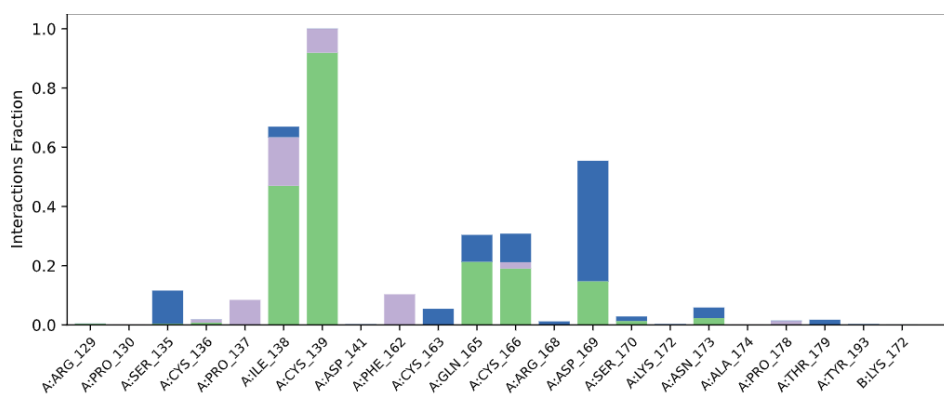


Рисунок А.11.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом 8018-6498

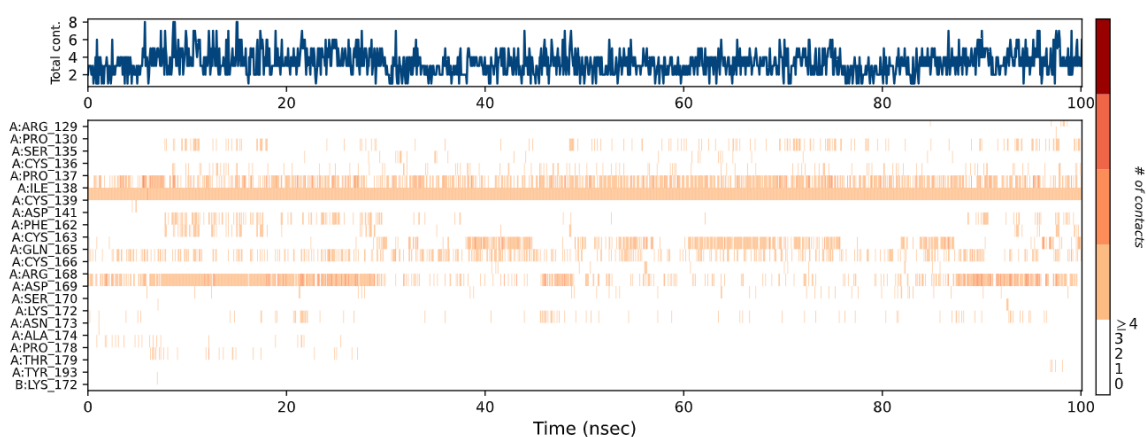


Рисунок А.11.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

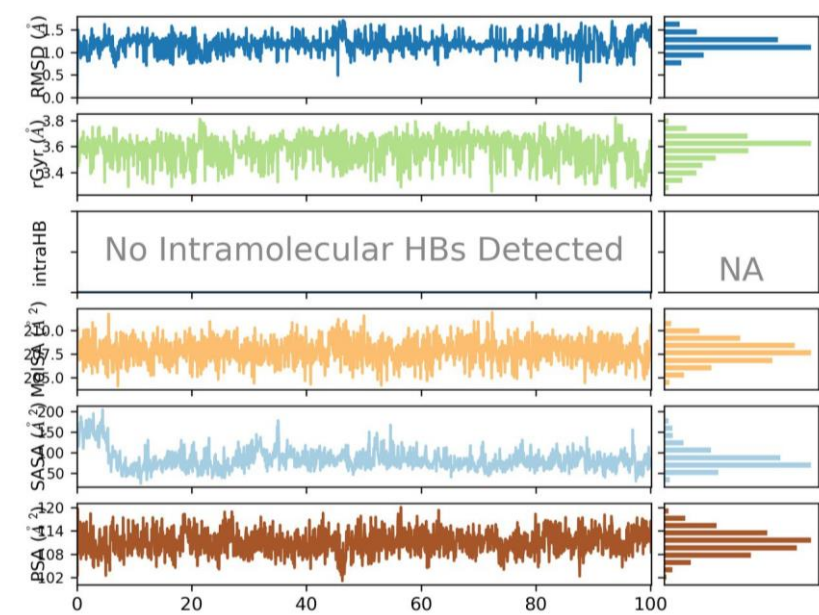


Рисунок А.11.9 – Свойства лиганда 8018-6498

Продолжение Приложения А

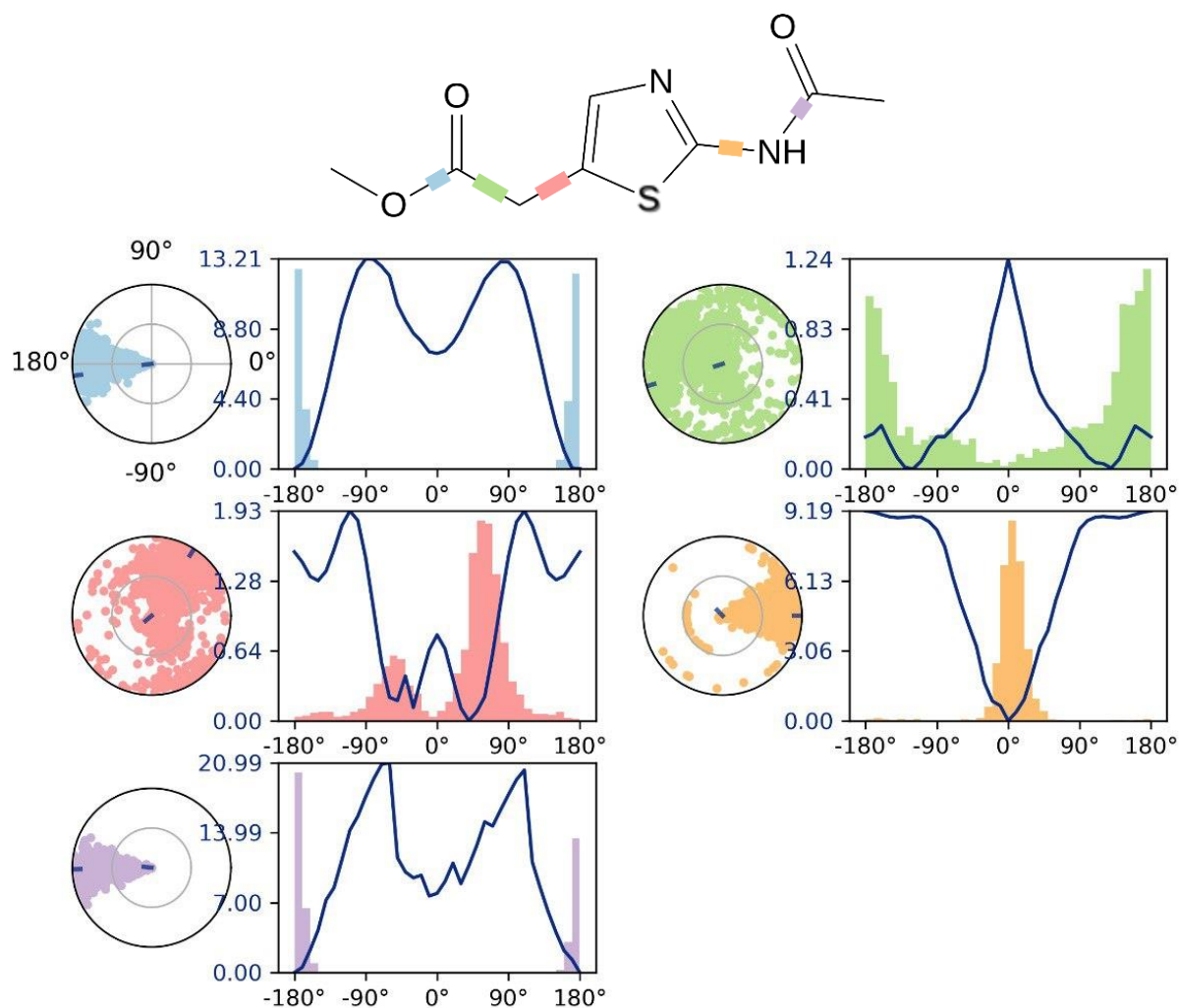


Рисунок А.11.10 – Конформационный профиль 8018-6498

Отчет А.12. Молекулярно-динамическая симуляция соединения ZE09-1936

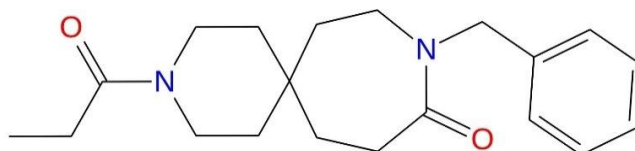


Рисунок А.12.1 – Структура лиганда ZE09-1936

Продолжение Приложения А

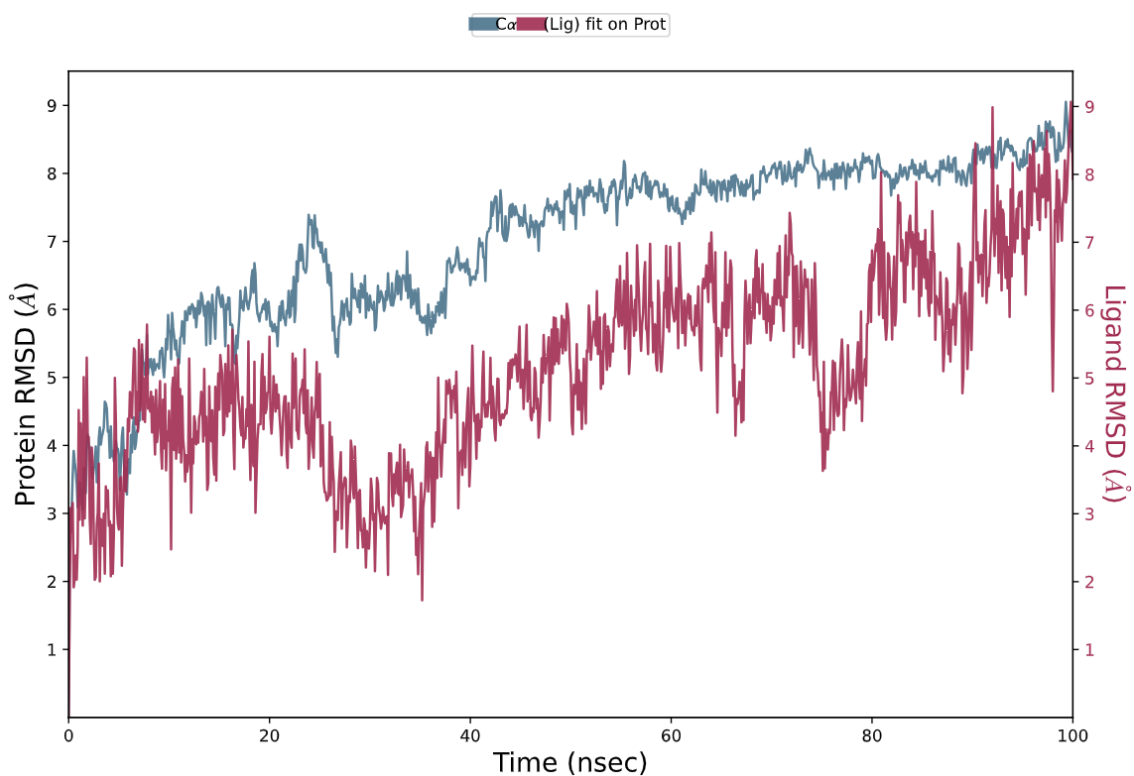


Рисунок А.12.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

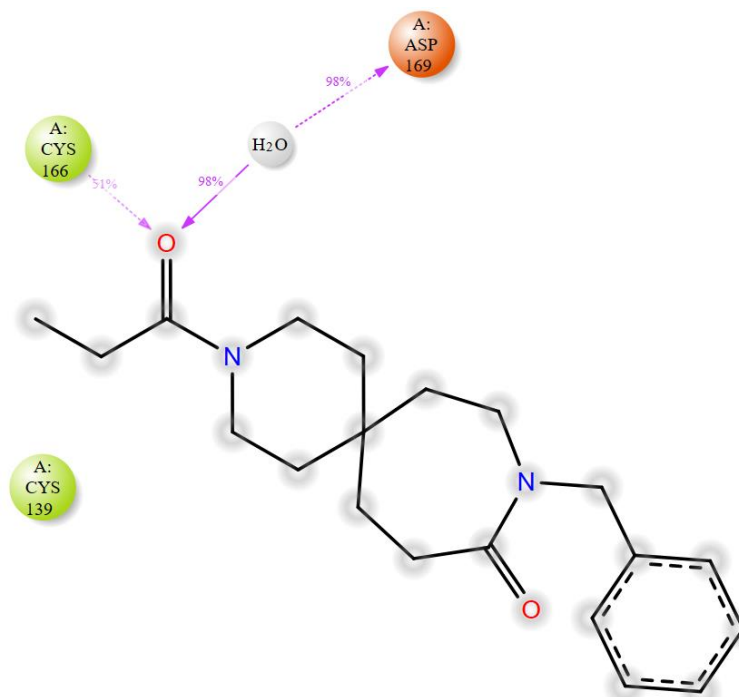


Рисунок А.12.3 – Детальное взаимодействие атомов ZE09-1936 с остатками белка

Продолжение Приложения А

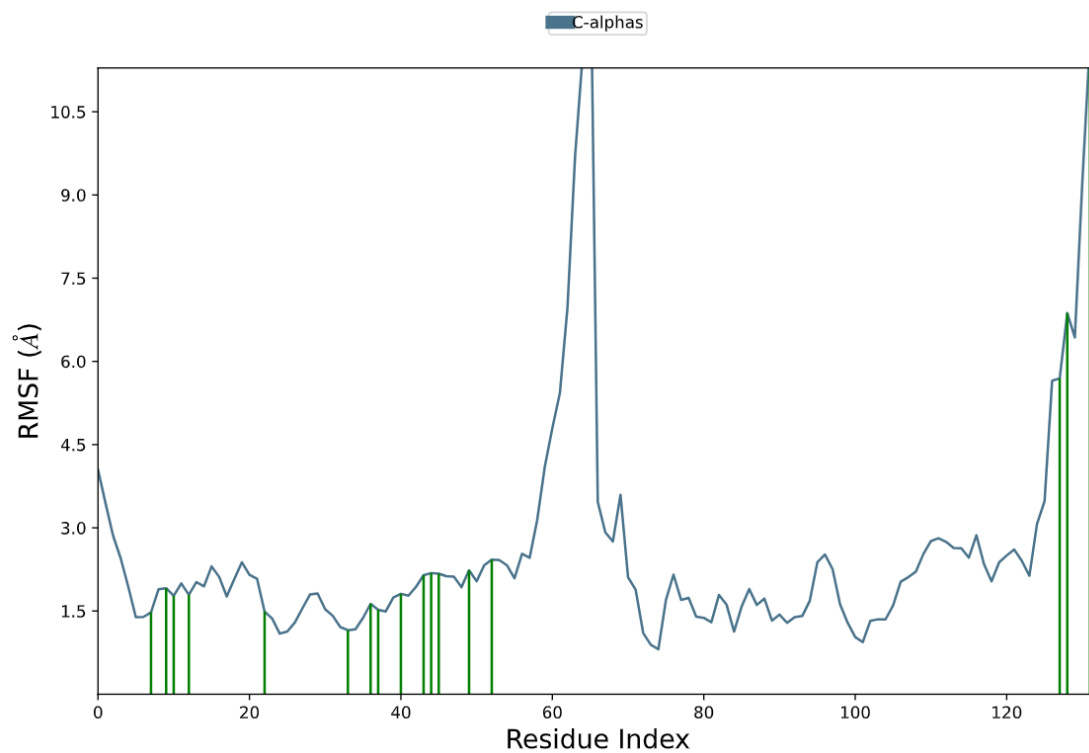


Рисунок А.12.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

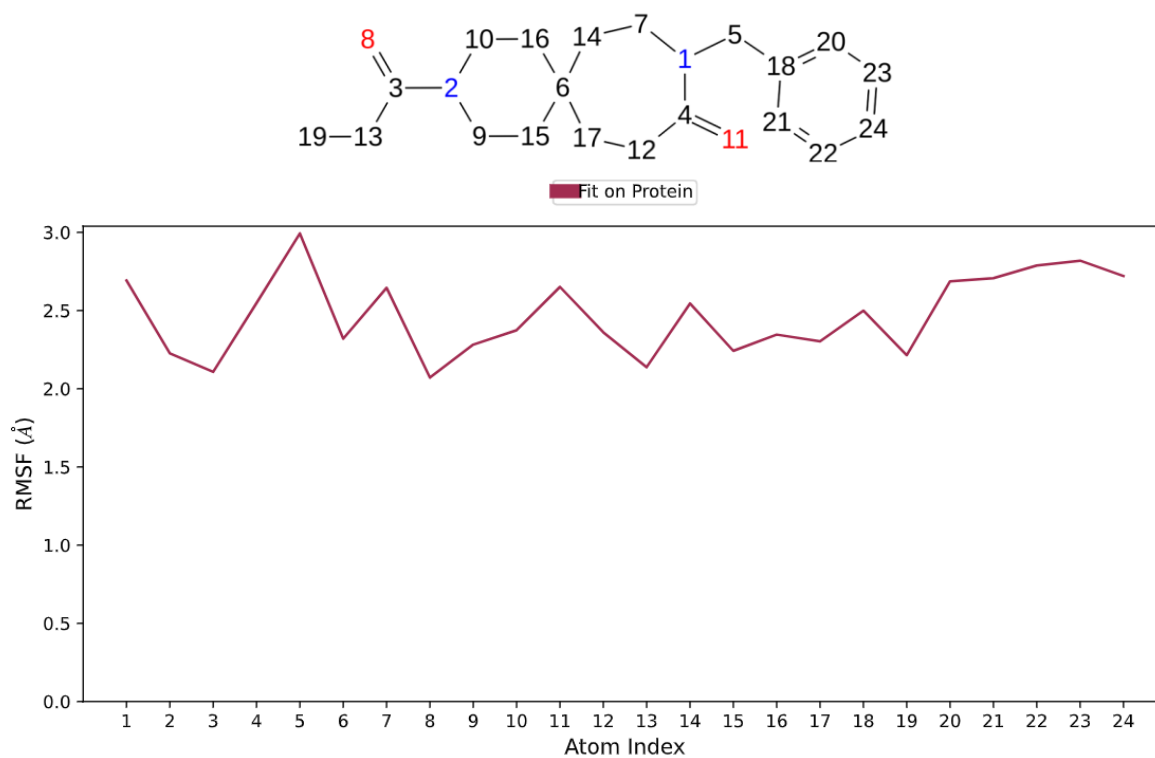


Рисунок А.12.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда ZE09-1936

Продолжение Приложения А

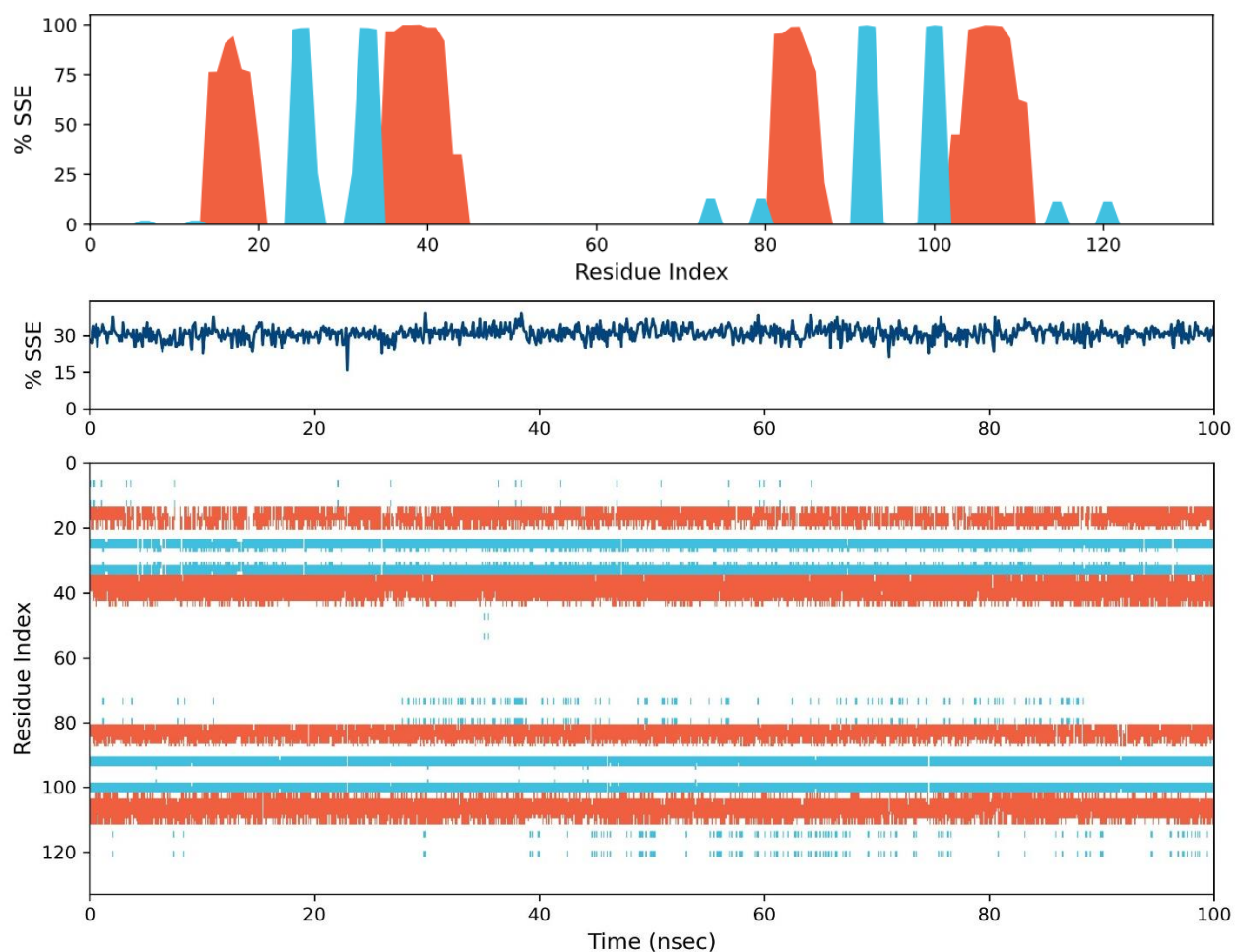


Рисунок А.12.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

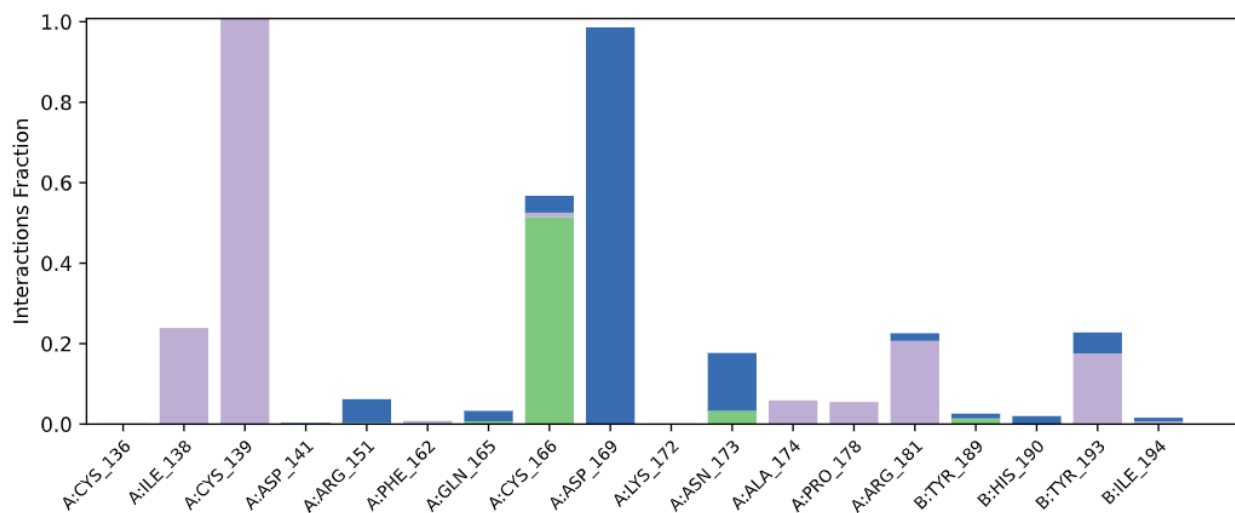


Рисунок А.12.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом ZE09-1936

Продолжение Приложения А

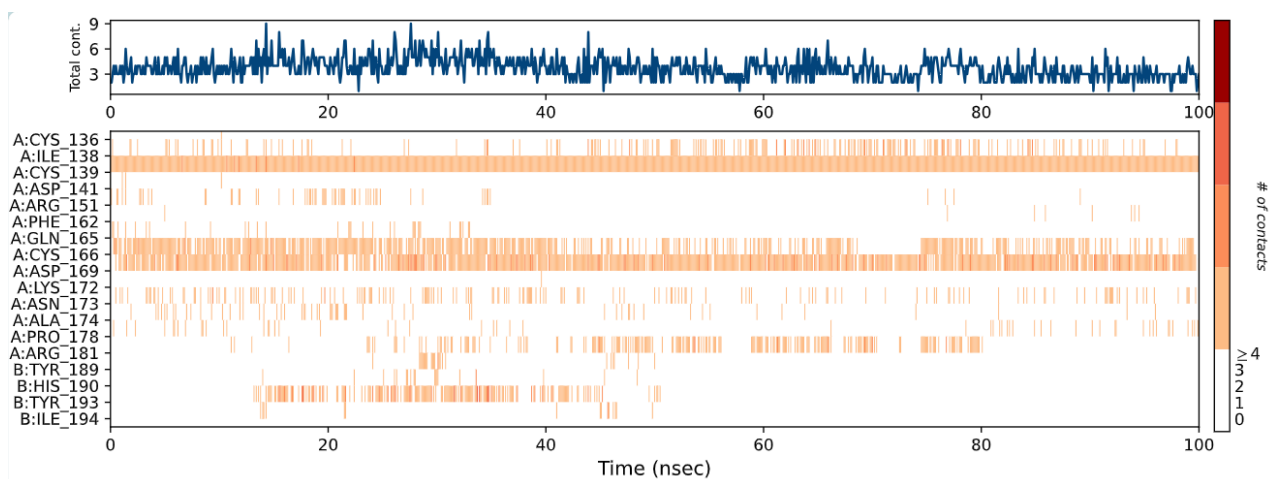


Рисунок А.12.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

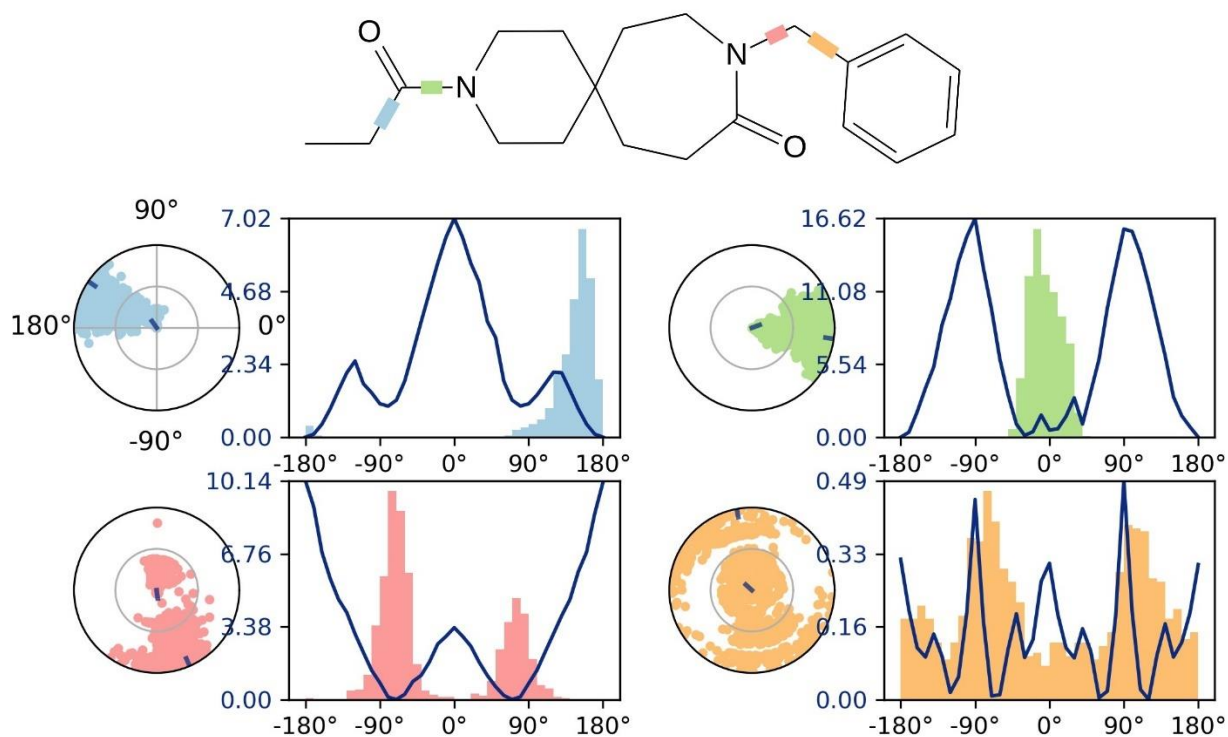


Рисунок А.12.9 – Конформационный профиль ZE09-1936

Продолжение Приложения А

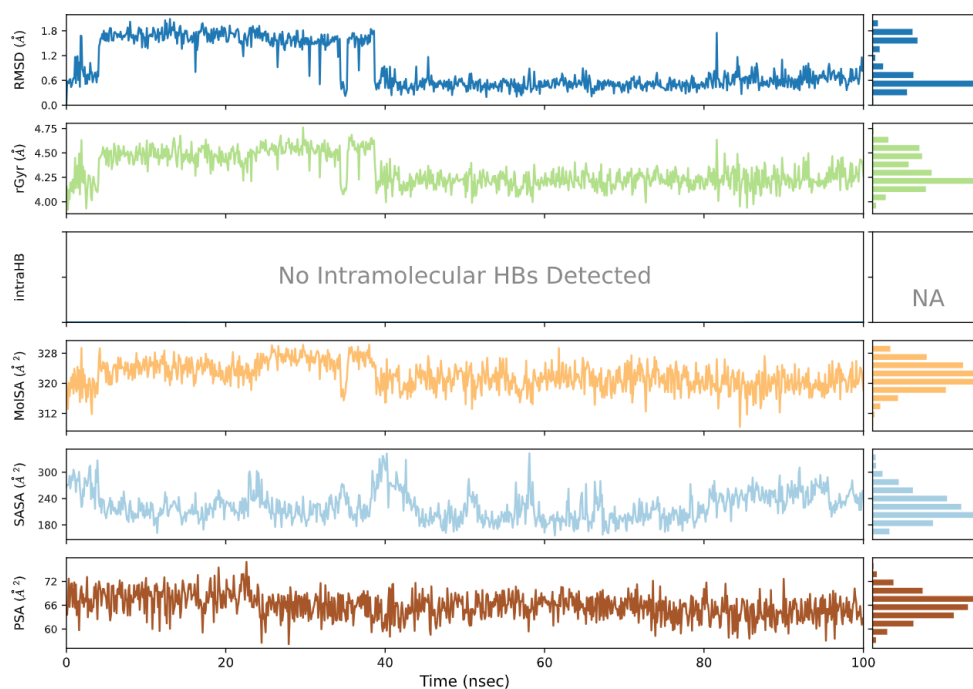


Рисунок А.12.10 – Свойства лиганда ZE09-1936

Отчет А.13. Молекулярно-динамическая симуляция соединения T001-1322

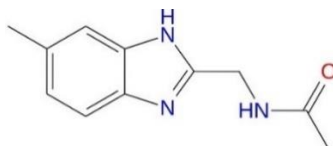


Рисунок А.13.1 – Структура лиганда T001-1322

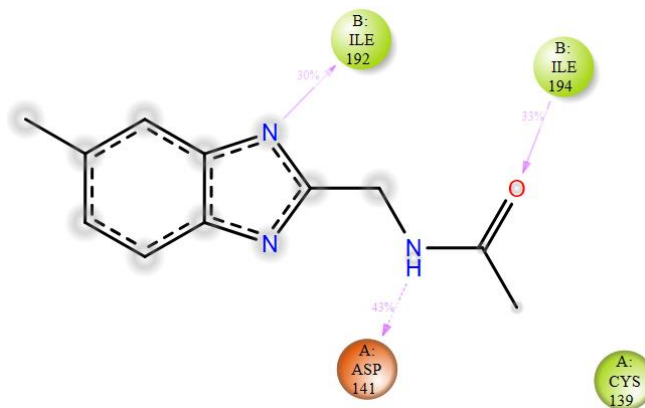


Рисунок А.13.2 – Детальное взаимодействие атомов T001-1322 с остатками белка

Продолжение Приложения А

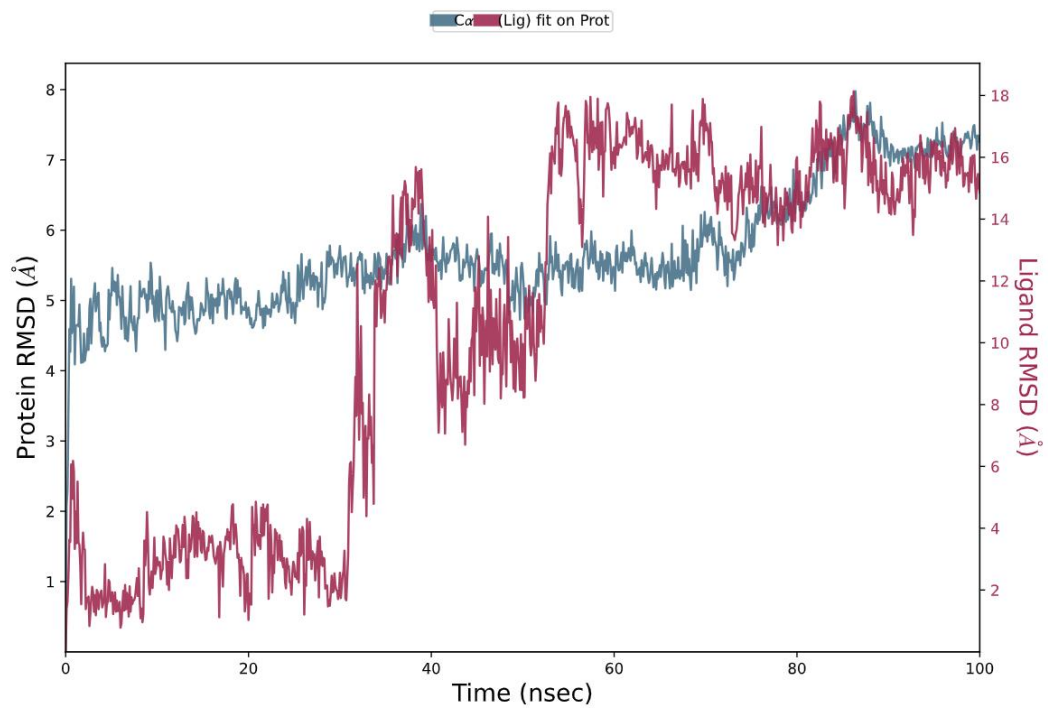


Рисунок А.13.3 – График зависимости RMSD от времени моделирования

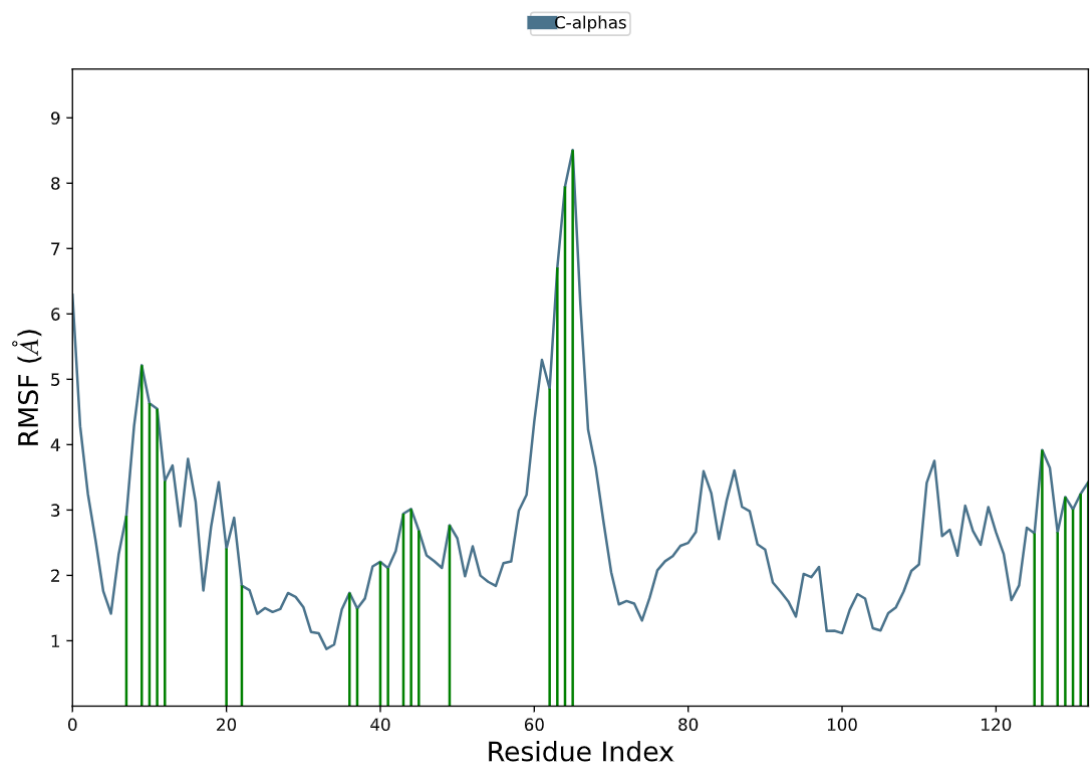


Рисунок А.13.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

Продолжение Приложения А

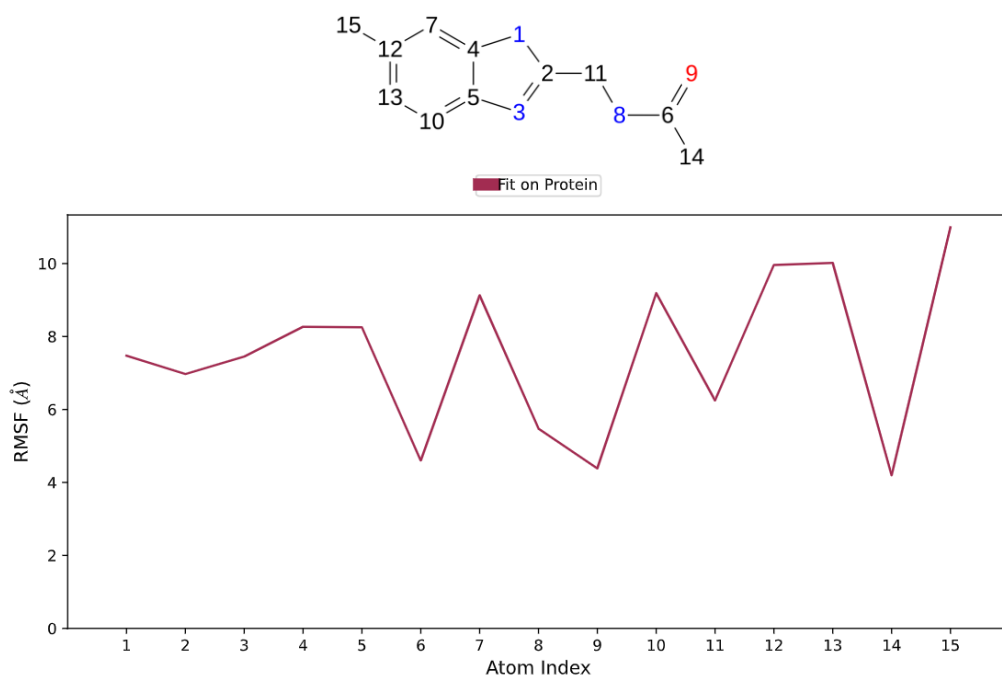


Рисунок А.13.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда T001-1322

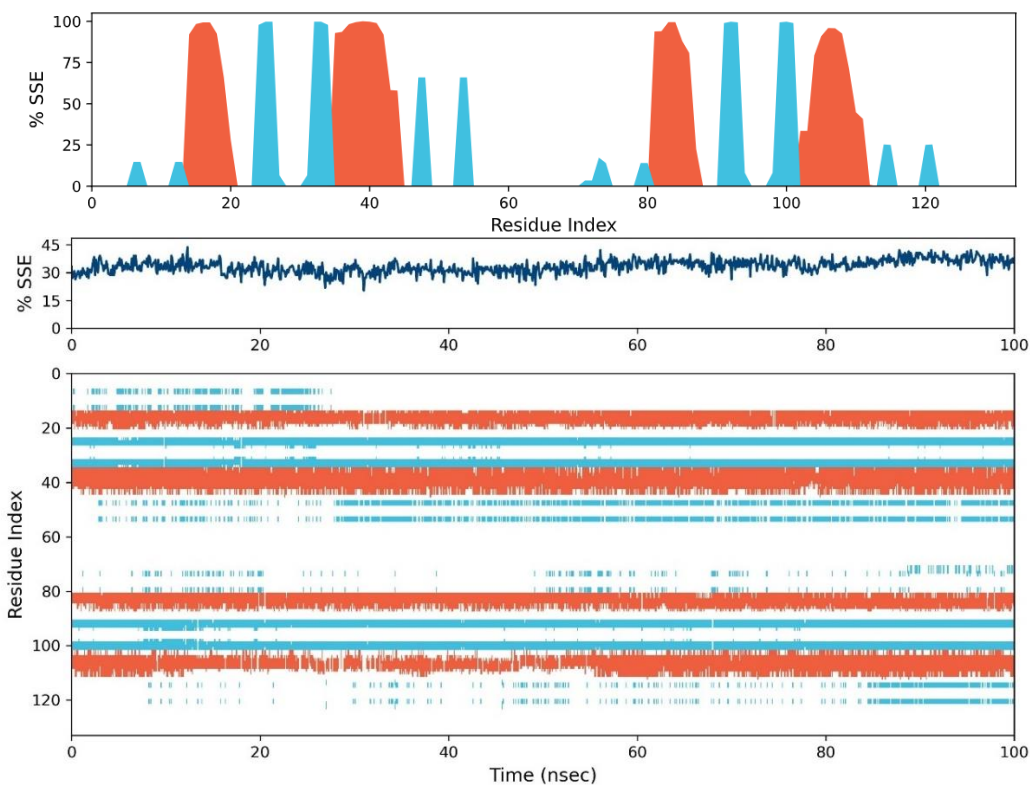


Рисунок А.13.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

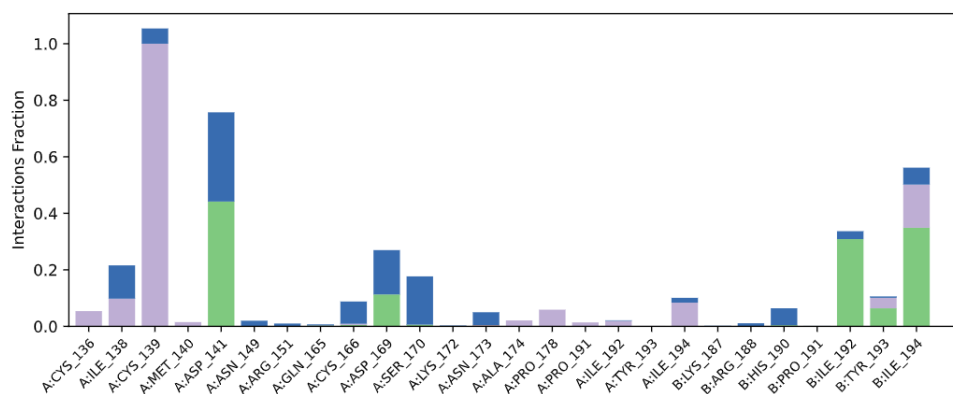


Рисунок А.13.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом T001-1322

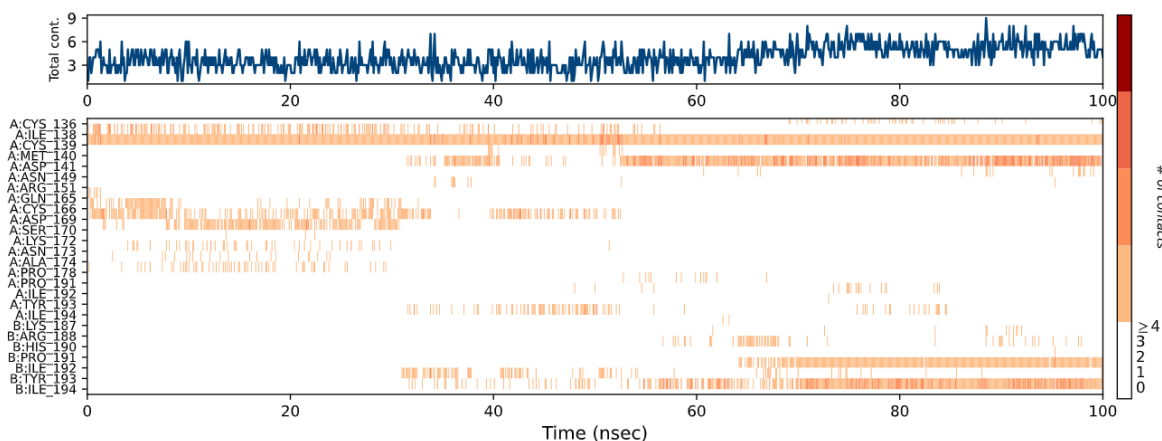


Рисунок А.13.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

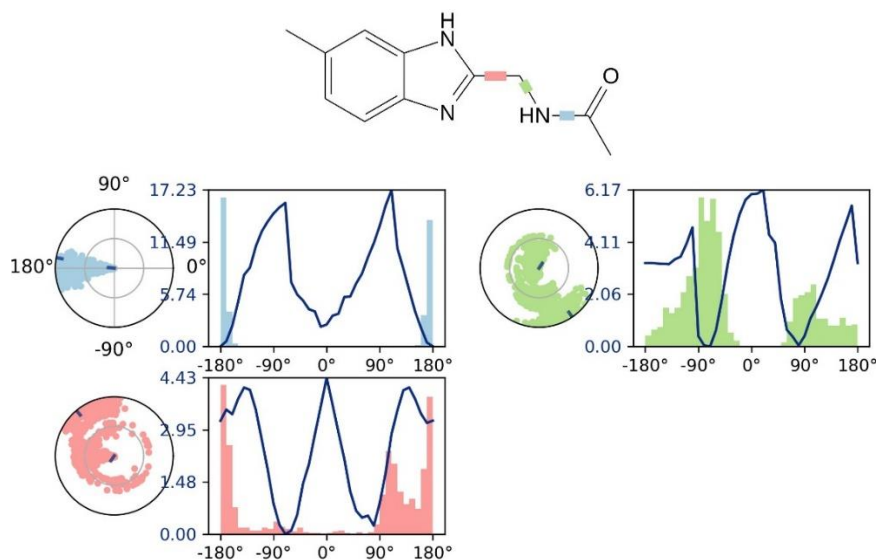


Рисунок А.13.9 – Конформационный профиль T001-1322

Продолжение Приложения А

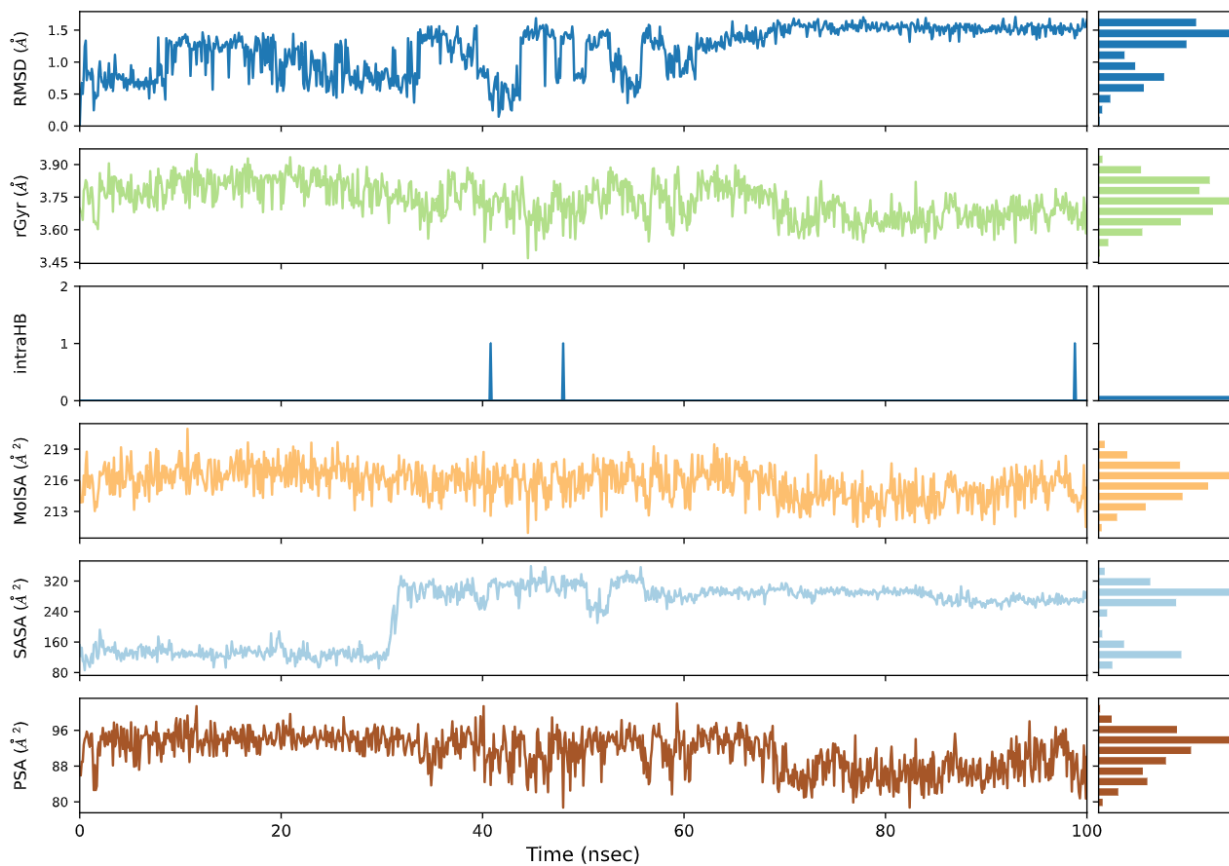


Рисунок А.13.10 – Свойства лиганда T001-1322

Отчет А.14. Молекулярно-динамическая симуляция соединения Y020-9951

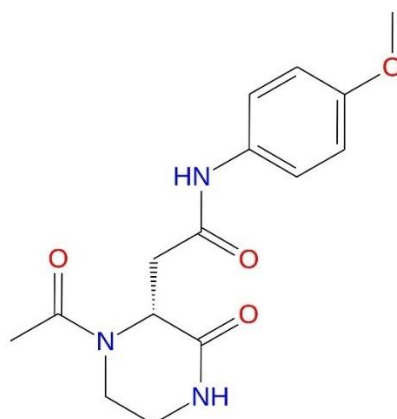


Рисунок А.14.1 – Структура лиганда Y020-9951

Продолжение Приложения А

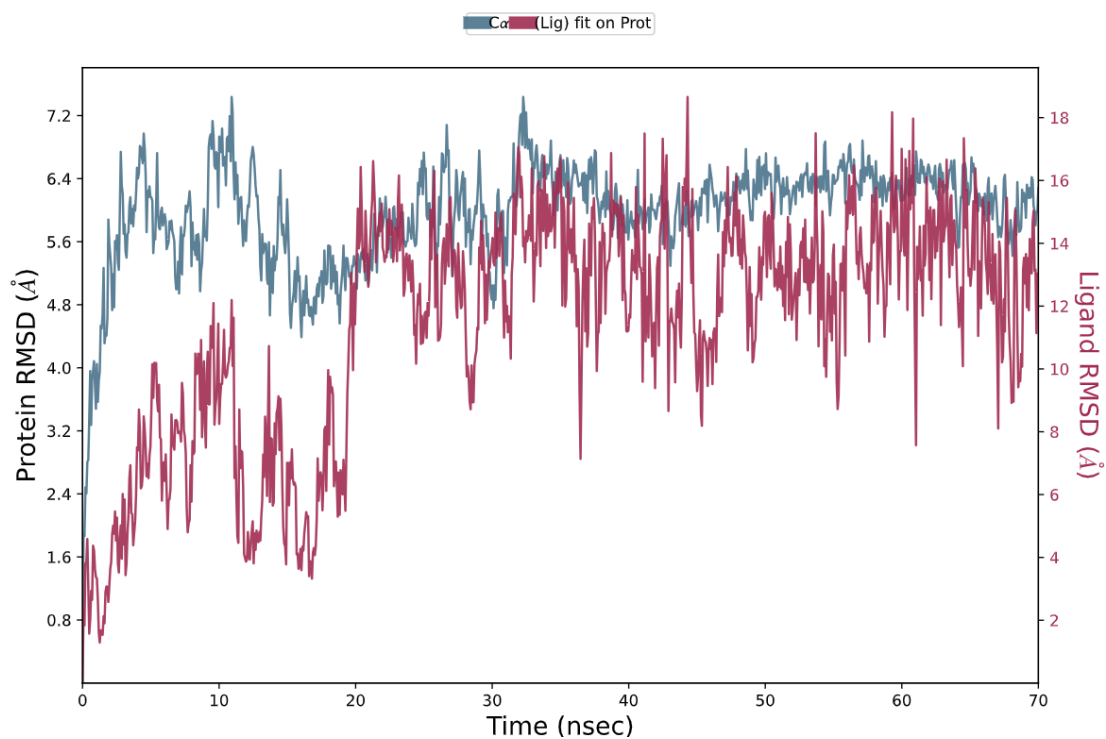


Рисунок А.14.2 – График зависимости RMSD от времени моделирования

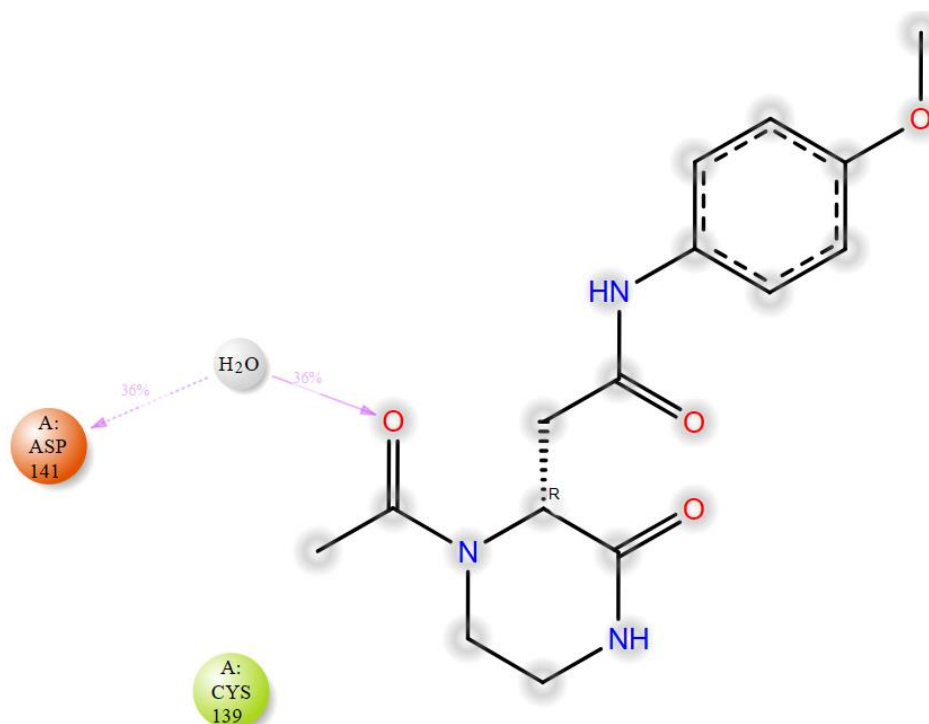


Рисунок А.14.3 – Детальное взаимодействие атомов Y020-9951 с остатками белка

Продолжение Приложения А

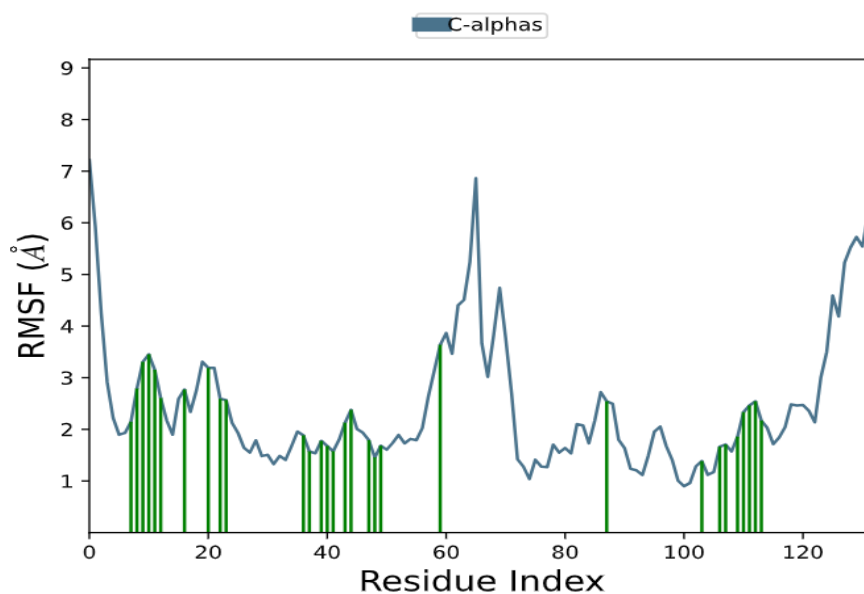


Рисунок А.14.4 – График зависимости RMSF от индекса остатка белка

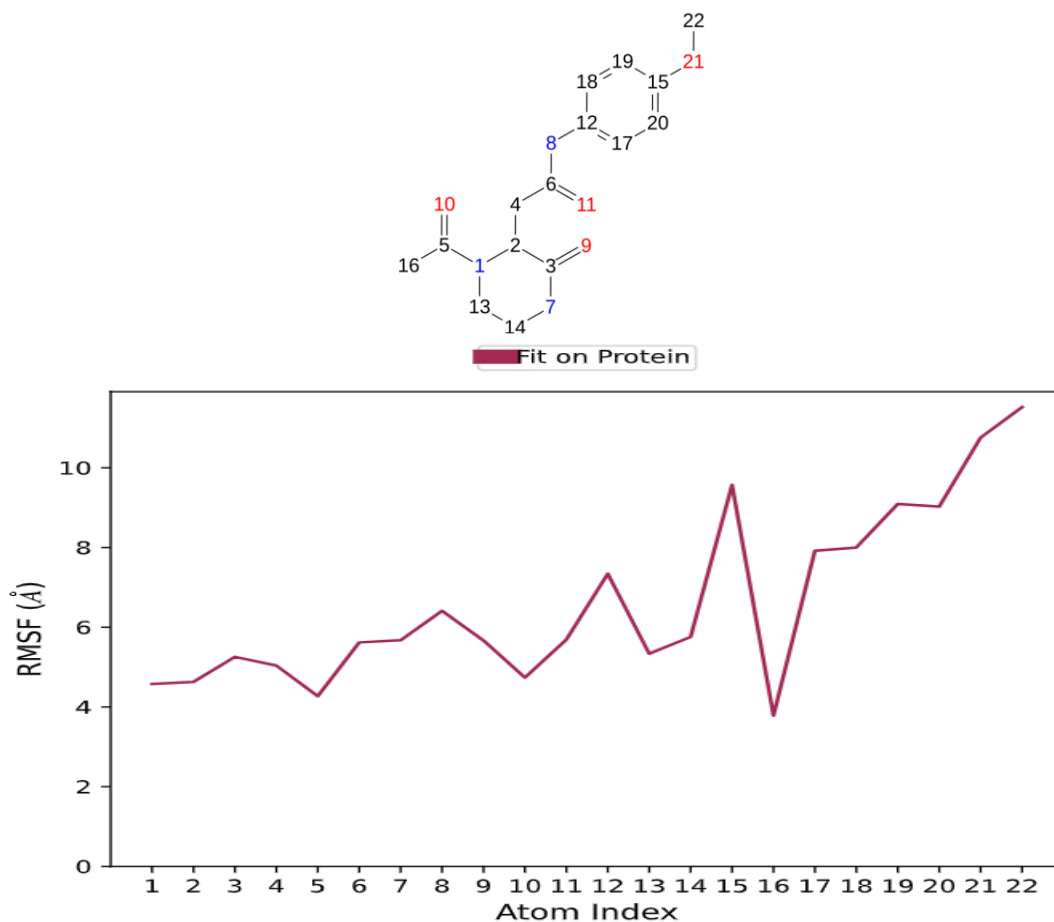


Рисунок А.14.5 – График зависимости RMSF от номера атома лиганда Y020-9951

Продолжение Приложения А

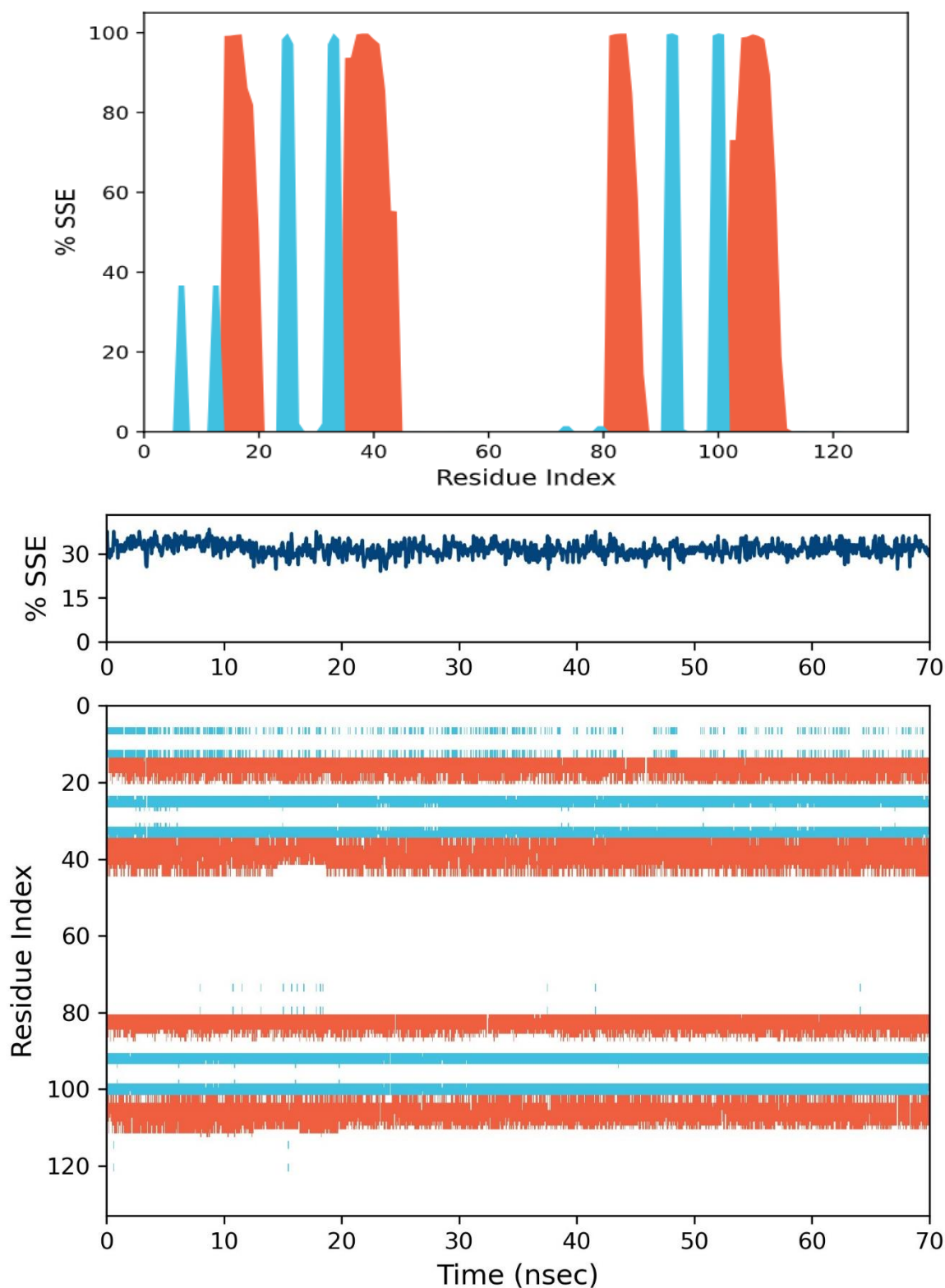


Рисунок А.14.6 – Распределение элементов вторичной структуры белка по индексам остатков белка

Продолжение Приложения А

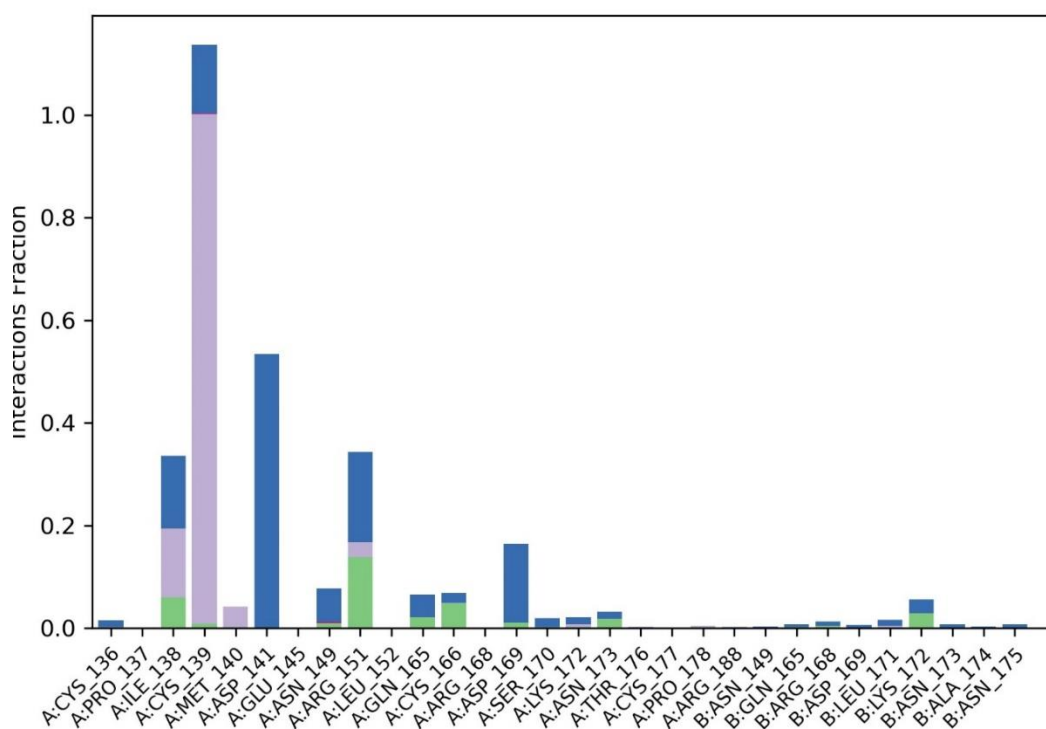


Рисунок А.14.7 – Диаграмма взаимодействия белка с лигандом Y020-9951

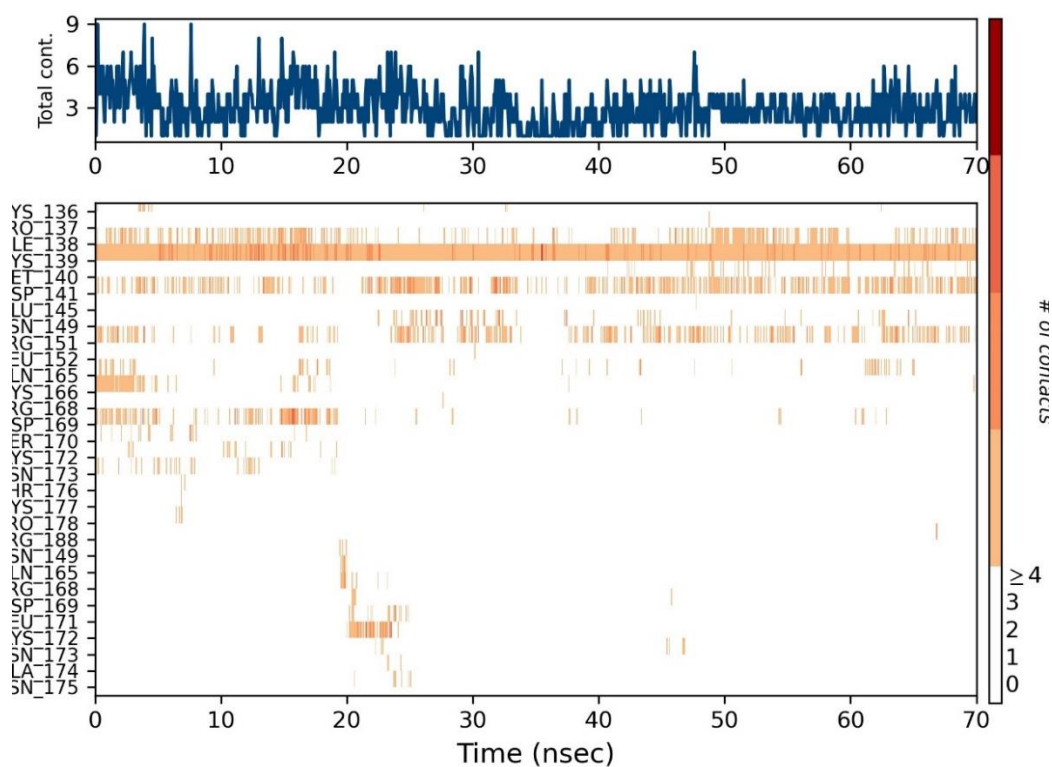


Рисунок А.14.8 – Карта взаимодействия остатков белка с лигандом

Продолжение Приложения А

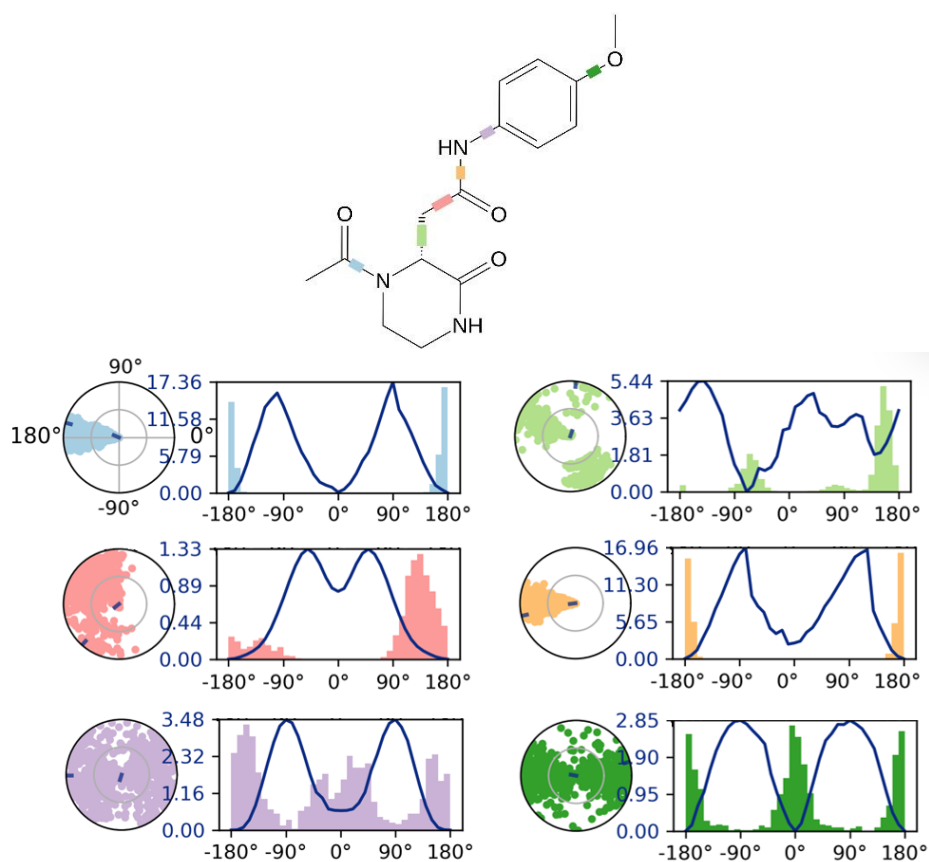


Рисунок А.14.9 – Конформационный профиль Y020-9951

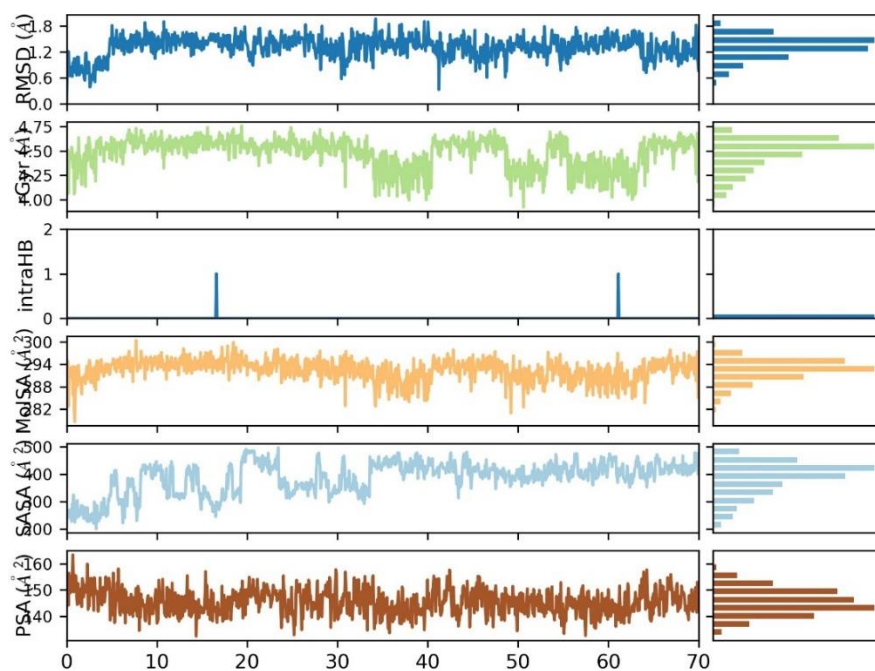
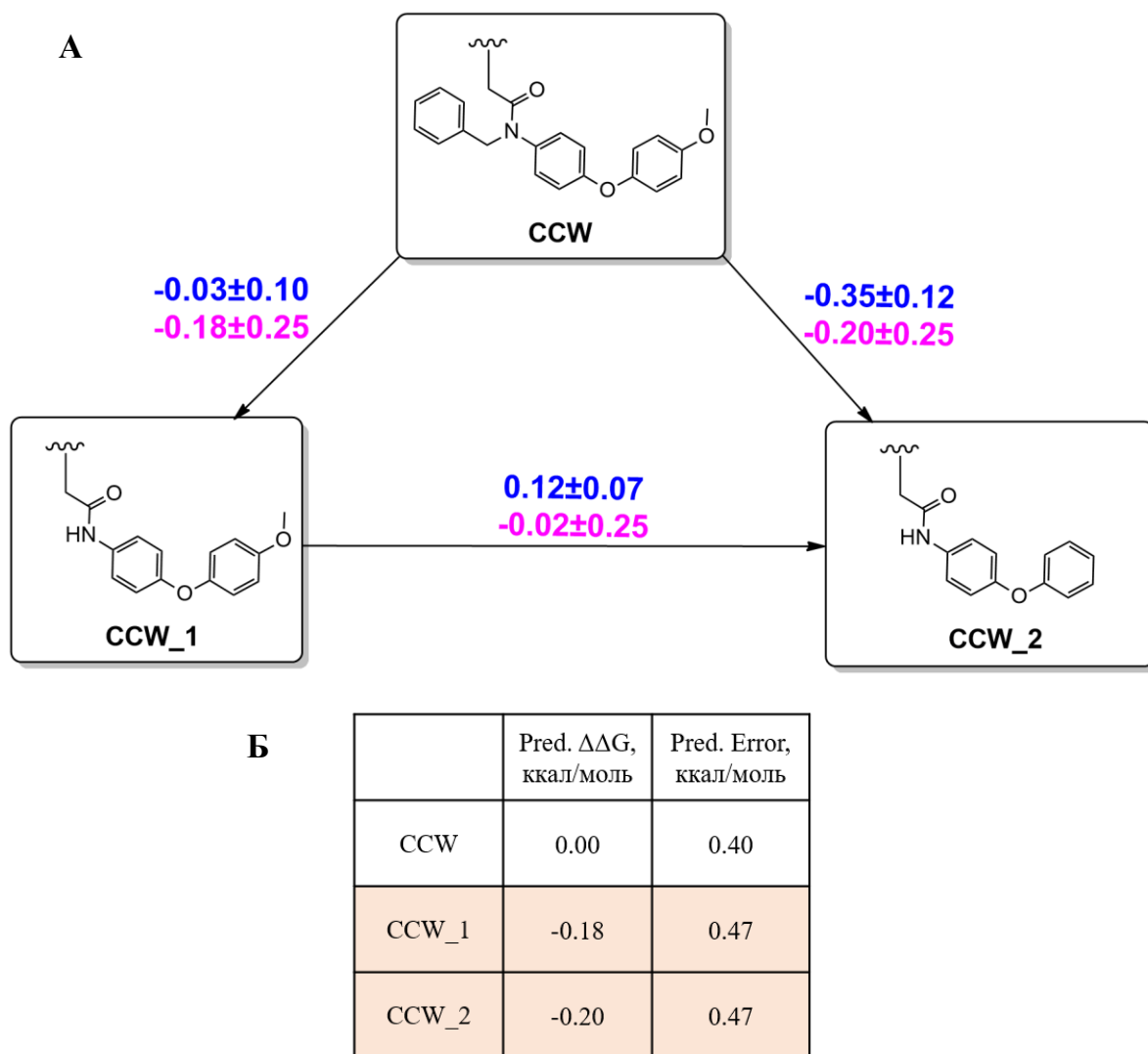


Рисунок А.14.10 – Свойства лиганда Y020-9951

Приложение Б

Результаты расчета относительной энергии связывания, полученные с помощью метода FEP

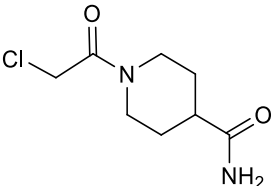
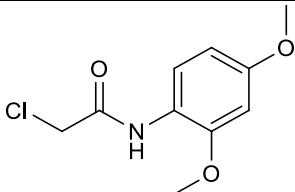
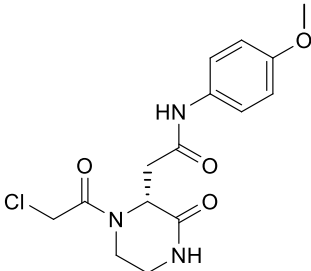
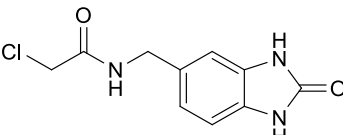
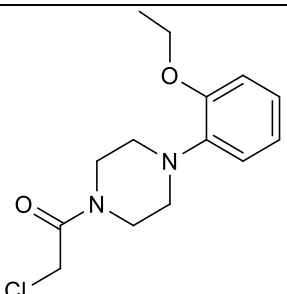
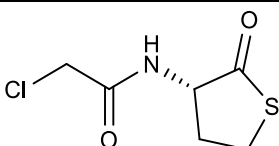
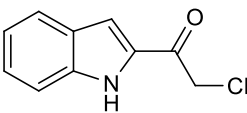


Синий – энергия, рассчитанная методом VAR; Фиолетовый – энергия замыкания цикла
А – Карта возмущений; Б – Обобщенные данные карты

Рисунок Б.1 – Данные расчета относительной энергии связывания нативного лиганда в мономере

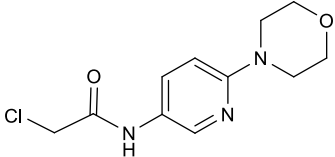
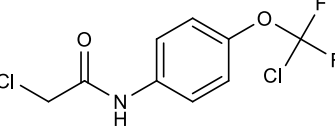
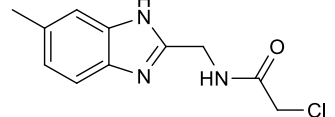
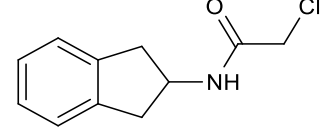
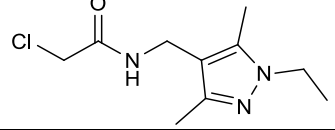
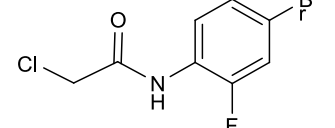
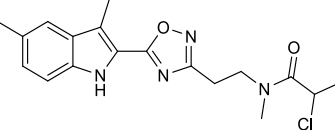
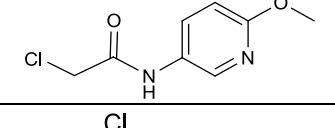
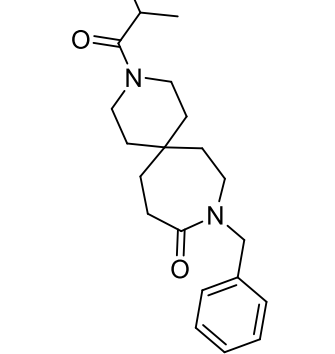
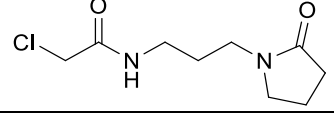
Приложение В
Результаты ковалентной стыковки

Таблица В.1 – Результаты ковалентного докинга библиотеки соединений

Структура	Код соединения	MM GBSA ΔG_{bind} , ккал/моль	Prime Energy, ккал/моль	CDock Affinity, ккал/моль
1	2	3	4	5
	Y020-5255	-15.73	-4354.6	-3.195
	R052-1725	-17.93	-4330.4	-2.851
	Y020-9951	-23.62	-4356.3	-2.817
	8018-7135	-16.15	-4387.7	-2.780
	T001-1017	-17.46	-4273.3	-2.663
	8019-7122	-14.87	-4329.4	-2.641
	6292-0250	-10.67	-4287.5	-2.598

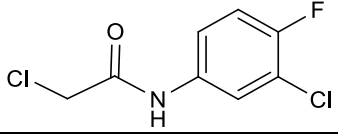
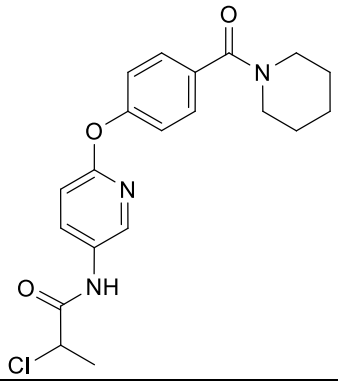
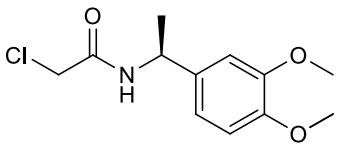
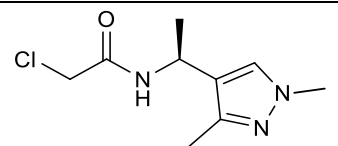
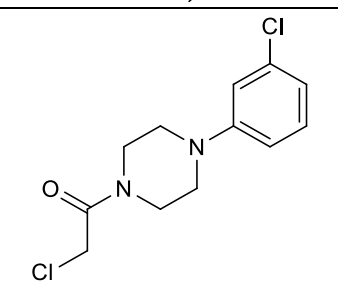
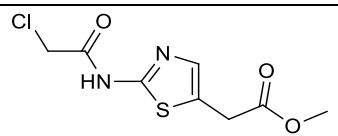
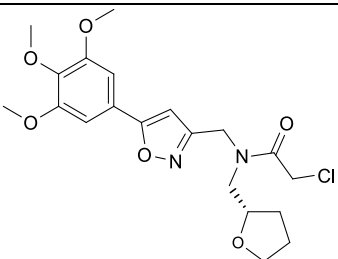
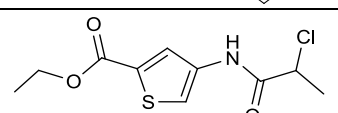
Продолжение Приложения В

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5
	ZE09-1182	-22.46	-4308.7	-2.576
	8011-6560	-20.50	-4347.7	-2.574
	T001-1322	-16.78	-4352.5	-2.531
	8018-4716	-14.32	-4354.9	-2.480
	T001-1392	-16.36	-4349.6	-2.461
	R152-1570	-15.90	-4334.3	-2.366
	ZE09-1290	-28.11	-4304.2	-2.361
	T001-0952	-17.85	-4337.3	-2.340
	ZE09-1936	-26.51	-4309.9	-2.310
	T001-0382	-18.08	-4364.9	-2.294

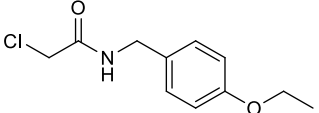
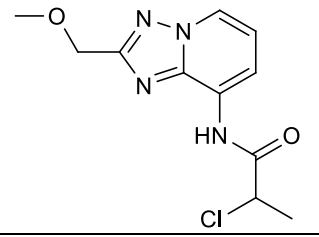
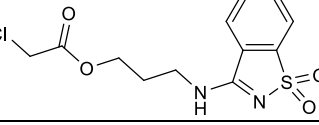
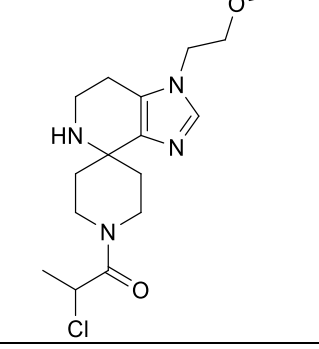
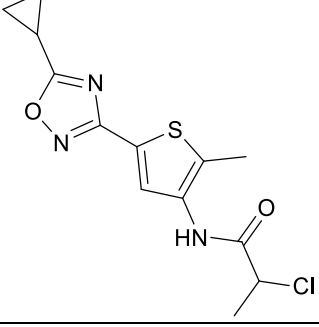
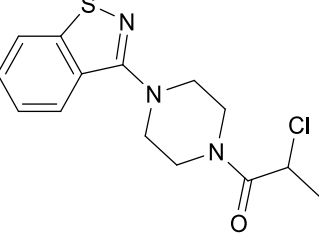
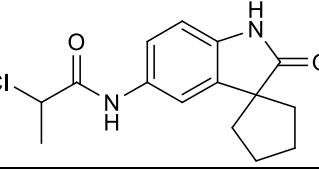
Продолжение Приложения В

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5
	R152-1954	-17.40	-4336.7	-2.229
	ZE09-0733	-27.55	-4318.5	-2.264
	T001-1599	-17.00	-4336.8	-2.184
	T001-1400	-15.18	-4360.8	-2.113
	T001-0450	-14.17	-4303.2	-2.066
	8018-6498	-18.81	-4336.5	-2.044
	V002-0745	-20.46	-4300.2	-2.009
	ZE09-1286	-20.84	-4348.6	-1.987

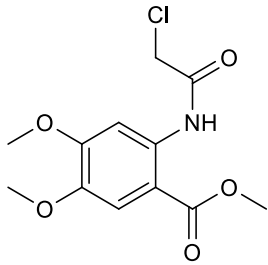
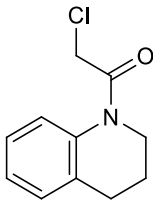
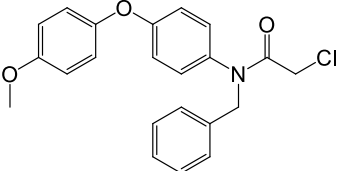
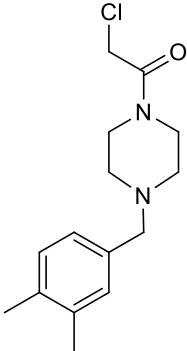
Продолжение Приложения В

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5
	T001-1882	-21.24	-4346.3	-1.980
	ZE09-1192	-23.42	-4266.2	-1.923
	4816-0003	-18.18	-4345.9	-1.828
	ZE09-1535	-20.31	-4333.2	-1.811
	ZE09-1329	-24.32	-4321.6	-1.777
	ZE09-1379	-17.40	-4276.2	-1.731
	ZE09-1274	-20.80	-4321.2	-1.663

Продолжение Приложения В

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5
	Y020-5248	-17.19	-4328.7	-1.651
	R152-0359	-3.83	-4287.6	-1.609
	CCW-16	-26.31	-4313.6	-1.574
	T001-1615	-19.94	-4331.4	-1.390