

## ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ ТИОЛОВОЙ ПРИРОДЫ ДЛЯ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6

© 2018 г. М.С. Кондратьев\*, Е.В. Захарова\* \*\*

\*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

\*\*Биотехнологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/51

E-mail: ma-ko@bk.ru

Поступила в редакцию 05.07.18 г.

Проведен виртуальный скрининг возможных тиоловых восстановителей для пероксиредоксина 6, который является одним из важнейших компонентов антиоксидантной системы ряда живых организмов, в том числе человека. Механизм действия белка был изучен ранее, однако поиск для него новых восстановителей и их исследование до сих пор является актуальной задачей. Согласно гипотезе авторов такими агентами могут выступать не только низкомолекулярные тиоловые соединения, но и короткие цистеинсодержащие пептиды. В работе смоделированы и проанализированы взаимодействия между пероксиредоксином 6 и следующими соединениями: каптоприлом, унитиолом, сукцимером, цистамином и тремя цистеинсодержащими пептидами ЕСЕСЕ, КСКСК и ССССС. При помощи методов молекулярного моделирования и докинга выявлены наиболее перспективные для дальнейшего изучения молекулы. Обнаружен новый «атипичный» сайт связывания для тиоловых лигандов на поверхности пероксиредоксина 6.

*Ключевые слова:* пероксиредоксин, молекулярный докинг, тиоловые соединения, восстановитель, молекулярное моделирование.

DOI: 10.1134/S0006302918050022

Одна из важнейших защитных систем организма – антиоксидантная система – работает совместно с белками теплового шока и цитокинами, чтобы предотвратить гибель клеток в результате клеточных стрессов различного генеза. Антиоксидантная система формируется за счет активности супероксиддисмутазы и ферментов-пероксидаз. В настоящее время пероксидазы подразделяют на каталазы и пероксиредоксины (Prx), в эту группу также входит и эволюционный потомок Prx – глутатионпероксидаза. Пероксиредоксины являются одним из древнейших классов ферментов-антиоксидантов. Они представлены во всех организмах и способны разлагать широкий спектр перекисных соединений –  $H_2O_2$ , органические перекиси и пероксинитрилы – в концентрациях, близких к физиологическим (от 10 до 200 мкМ). Работа пероксиредоксинов не зависит от наличия кофактора, однако требует присутствия восстановителя, которым, предположительно, может являться глутатион [1].

Как в про-, так и в эукариотах пероксиредоксины выполняют функцию защиты от ок-

сидативного стресса. По числу остатков цистеина в активном центре и механизму катализа, пероксиредоксины млекопитающих подразделяют на: типичные 2-Cys (Prx1–4), атипичные 2-Cys (Prx5) и 1-Cys (Prx6) [2]. Для представителей семейства Prx характерна высокая консервативность в аминокислотной последовательности и структуре пероксидазного центра [3]. Пероксидазный N-концевой остаток цистеина Cp-SH (peroxidic cysteine) находится в узком кармане, образованном мотивом «альфа-бета-альфа».

В данной работе нами был выполнен скрининг восстановителей тиоловой природы для белка Prx6 человека. Каталитический цикл молекулы пероксиредоксина, рассматриваемый на примере исследуемого белка Prx6 (рис. 1), состоит из трех условно разделяемых этапов. На первом этапе идет восстановление пероксида за счет окисления –SH-группы цистеина 47 до –SOH-группы (сульфеновая кислота). Образовавшийся остаток сульфеновой кислоты может окисляться и дальше до переокисленных состояний –SO<sub>2</sub>H и –SO<sub>3</sub>H, которые могут подвергаться регенерации только в случае –SO<sub>2</sub>H с затратой АТФ, а –SO<sub>3</sub>H является необратимо окисленной формой, приводящей к выходу фермента из строя [5,6]. Второй этап необходим

Сокращения: Prx – пероксиредоксины.

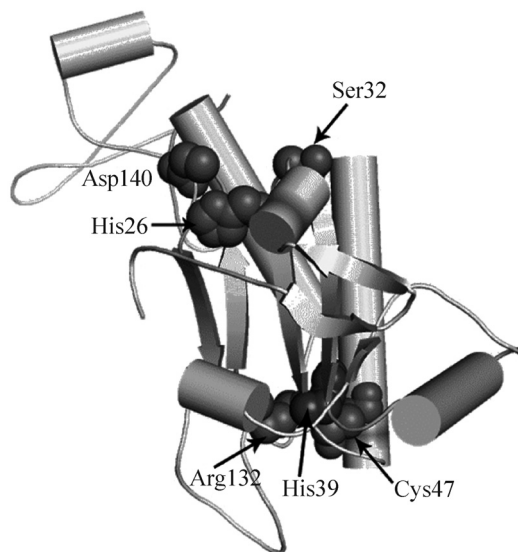
для восстановления  $\text{Cr-SOH}$  до исходного состояния  $\text{Cr-SH}$ . В ходе этого процесса образуется межмолекулярная дисульфидная связь.  $\text{Prx6}$  образует  $\text{S-S}$ -связь с низкомолекулярными тиолами ( $\text{Cr-S-S-R}$ ), которая затем восстанавливается на третьем этапе предположительно с помощью глутатиона и глутатион  $\text{S}$ -трансферазы  $\pi$  [1]. Однако возможна регенерация  $\text{Cr-SOH}$  и с помощью различных тиоловых соединений, исследованных в нашей работе. Для изучения нами были отобраны следующие тиоловые производные: каптоприл (( $\text{S}$ )-1-(3-меркапто-2-метил-1-оксопропил)- $\text{L}$ -пролин), сукцимер (мезо-2,3-димеркаптоянтарная кислота), унитиол (( $\text{RS}$ )-2,3-бис(сульфанил)пропан-1-сульфонат) и цистамин (бис( $\beta$ -аминоэтил)дисульфида дигидрохлорид). Эти соединения являются медицинскими препаратами в регистре лекарственных средств, они применяются как антидоты при отравлениях тяжелыми металлами, ртутью, мышьяком, в качестве радиопротекторов и для снижения артериального давления. Также в работе были использованы три цистеинсодержащих пептида:  $\text{Glu-Cys-Glu-Cys-Glu}$ ,  $\text{Lys-Cys-Lys-Cys-Lys}$  и  $\text{Cys-Cys-Cys-Cys}$ .

За счет своей простоты  $\text{Prx6}$  получил не только эволюционное преимущество, но и высокий потенциал применения в медицине: в качестве как средства диагностики, так и эффективного лекарственного препарата. Наиболее перспективным является возможное применение пероксиредоксина в терапии заболеваний, патологические процессы которых связаны с оксидативным стрессом [7–11]. Рассматривается перспектива применения данного белка в качестве радиопротектора [12,13].

Таким образом, целью данной работы является моделирование и скрининг лигандов тиоловой природы для белка  $\text{Prx6}$  человека с помощью методов компьютерного молекулярного моделирования.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для гибкого молекулярного докинга использовали семь молекул: четыре тиоловых соединения (цистамин, каптоприл, сукцимер, унитиол) и три цистеинсодержащих пептида ( $\text{ECECE}$ ,  $\text{KCKCK}$  и  $\text{CCCCC}$ ). Выбор таких лигандов обусловлен тем, что тиоловые соединения активно применяются в медицине в качестве антиоксидантов (в том числе в спортивной медицине [14]). Пептиды с цистеином были нами выбраны как потенциальные доноры протонов – для проверки гипотезы о том, как влияют аминокислотные остатки цистеина эндогенного происхождения на связывание с ис-



**Рис. 1.** Структура молекулы  $\text{Prx6}$ : Asp140, Ser32, His26 – фосфолипазный центр; Arg132, Cys47, His39 – пероксидазный центр (по работе [4]).

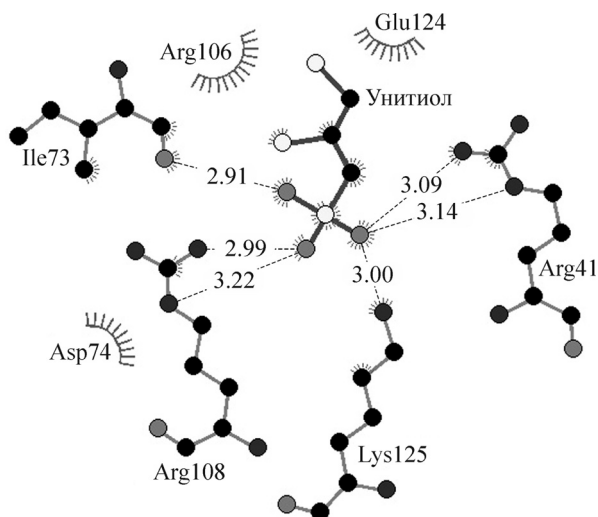
следуемым белком, а также влияние окружения на это связывание – положительно ( $\text{KCKCK}$ ) и отрицательно ( $\text{ECECE}$ ) заряженных аминокислотных остатков и полностью нейтральной молекулы ( $\text{CCCCC}$ ). Рецептор – белок  $\text{Prx6}$  человека.

Модели тиоловых лигандов были построены в молекулярном конструкторе HyperChem 8.0.10 (<http://www.hyper.com/>) затем их геометрия была оптимизирована с помощью методов молекулярной динамики ( $\text{MM}^+$ ). Для уточнения структуры и расстановки зарядов каждая молекула была дополнительно оптимизирована с помощью полуэмпирических квантово-химических расчетов ( $\text{PM3}$ ) [15].

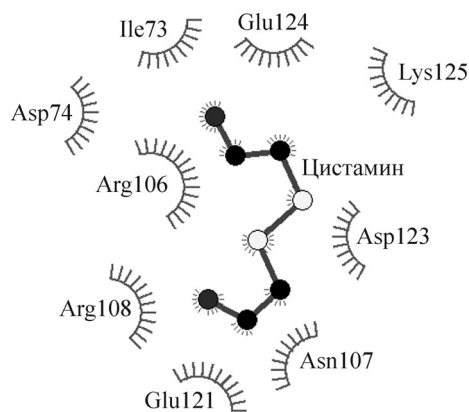
Для подготовки лигандов к докингу был использован пакет Autodock tools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>), а сам докинг осуществлялся в Autodock Vina (<http://vina.scripps.edu>). В Autodock tools были заданы углы свободного торсионного вращения у лигандов, а также определена «коробка докинга» исследуемого белка. Докинг в Autodock Vina был выполнен в пяти повторностях – с целью повышения точности и воспроизводимости результатов (для снижения влияния «random seed» – случайного выбора программой первого положения лиганда на рецепторе и конформации самого лиганда).

Анализ связывания лиганд-рецептор был произведен первично в Autodock tools, затем в пакете LigPlot+ с построением разверток, наглядно демонстрирующих межмолекулярные взаимодействия (гидрофобные и путем образо-





**Рис. 4.** Водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком-рецептором Prx6 и лигандом – унитиолом.



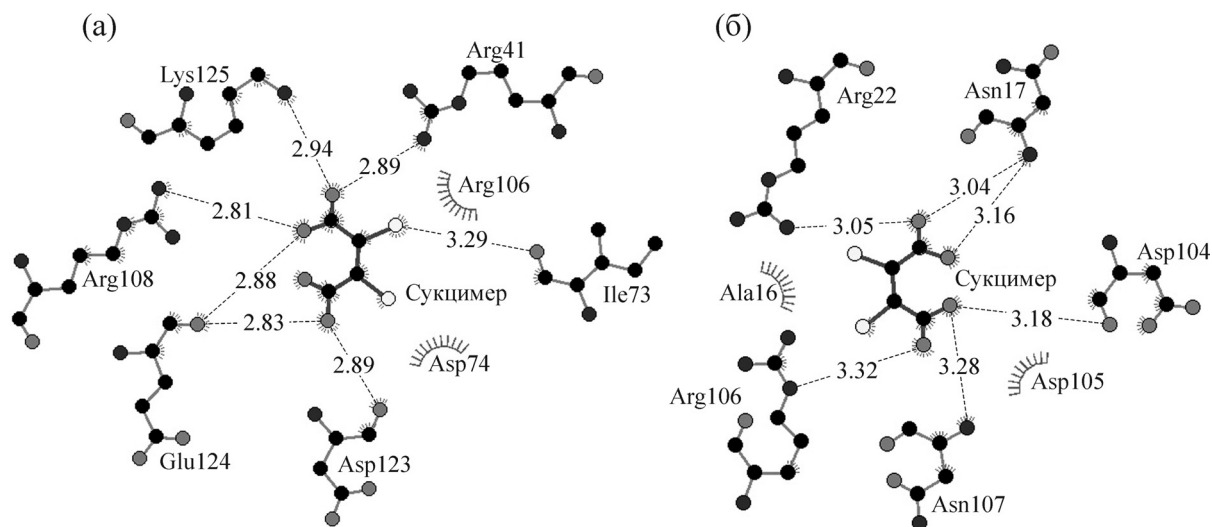
**Рис. 5.** Водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком-рецептором Prx6 и лигандом – цистамином.

Однако участок связывания оказался несколько меньшим вследствие уменьшения размера самого лиганда. Для унитиола наблюдалась аналогичная ситуация (рис. 4). Цистамин связывался так же в типичном сайте, для этой молекулы мы наблюдали только гидрофобные взаимодействия при связывании (рис. 5).

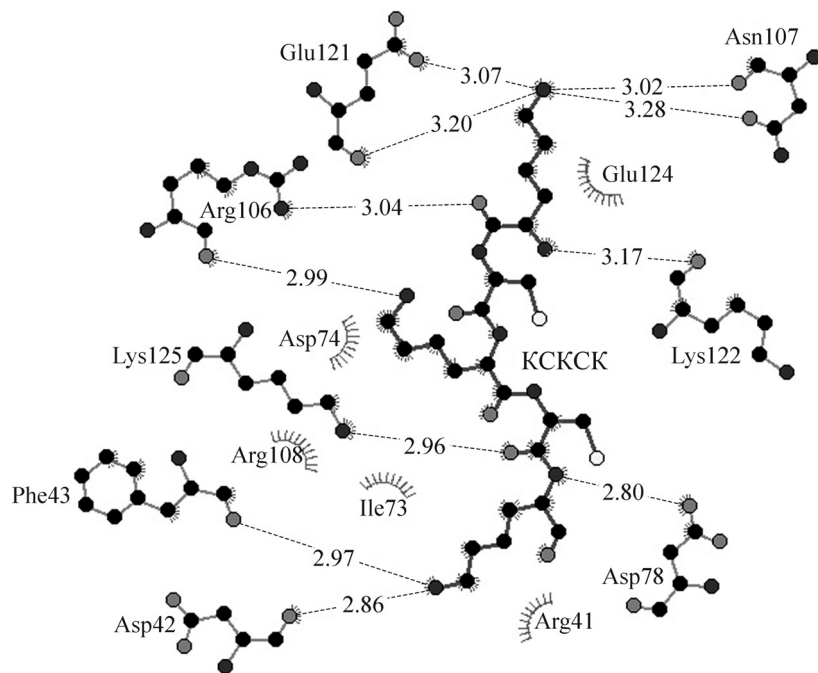
Для молекулы сукцимера связывание отмечалось нами не только в типичном сайте (рис. 6а), но и во втором «атипичном» сайте, расположенном в непосредственной близости к типичному сайту, средние значения энергии – 4,48 ккал/моль. При преимущественном связывании во втором сайте принимали участие часть

типичных аминокислотных остатков – Arg106, Asn107, Arg108, так и аналогичные остатки аргинина и аспарагина, но расположенные ближе к N-концевой части молекулы белка – Ala16, Asn17, Arg22 (рис. 6б). Подобный сайт регистрировался для всех лигандов, но только у сукцимера преимущественное связывание происходило именно в данном «атипичном» сайте.

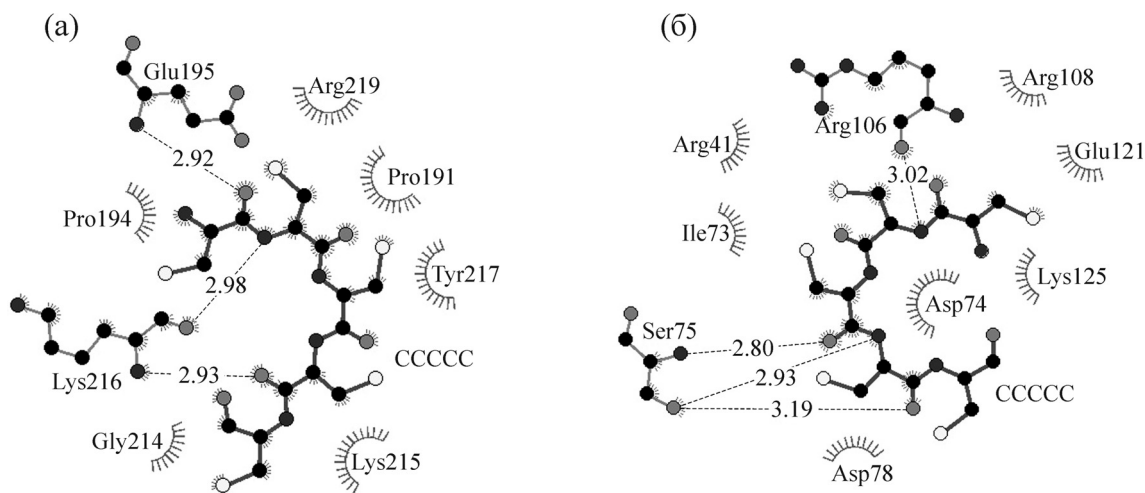
Короткий пептид КСКСК, состоящий из трех остатков лизина и двух остатков цистеина, связывался с пероксиредоксином с довольно высокой средней энергией связывания – –5,64 ккал/моль, но, несмотря на это, высокая частота «ошибочного» связывания (в среднем из девяти конформеров от пяти до трех связывались на других частях молекулы). Связывание в типичном сайте происходило с теми же аминокислотными остатками (рис. 7).



**Рис. 6.** Водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком-рецептором Prx6 и лигандом – сукцимером: (а) – типичный сайт докинга, (б) – атипичный сайт докинга.



**Рис. 7.** Водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком-рецептором Prx6 и лигандом – коротким пептидом KCKCK.



**Рис. 8.** Водородные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком-рецептором Prx6 и лигандом – коротким пептидом CCCCC: (а) – наиболее распространенный «ошибочный» сайт докинга, (б) – типичный сайт докинга.

Полистеиновый пептид CCCCC показал неожиданные результаты докинга – в более чем 75% случаев данная молекула связывалась в «ошибочных» участках, самым распространенным из которых была область на С-концевом участке белка в районе PRO191 (рис. 8а). В немногочисленных случаях связывания в типичном сайте (рис. 8б) свободная энергия составила  $-3,70$  ккал/моль.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования по изучению тиоловых лигандов белка Prx6 человека с помощью методов компьютерного молекулярного моделирования мы показали предпочтительное связывание с рецептором в типичном сайте для молекулы каптоприла и короткого пептида ЕСЕСЕ. Средние энергии такого связывания составили  $-5,18$  и  $-5,56$  ккал/моль соответственно.

Нами также было обнаружено два сайта связывания – типичный, образованный аминокислотными остатками Arg41, Ile73, Asp74, Ser75, Arg106, Asn107, Arg108, Lys122, Asp123, Glu124, Lys125, и атипичный, расположенный ближе к N-концевому участку молекулы и образованный остатками Ala16, Asn17, Arg22, Asp104, Asp105, Arg106, Asn107. Наибольшее сродство к новому атипичному сайту было показано для молекулы сукцимера.

Некоторые тиоловые соединения, демонстрирующие наибольшее сродство к белку – капторил и короткий цистеинсодержащий пептид ECESE, мы рекомендуем попробовать в качестве лиганда-восстановителя для белка Pgx6 человека.

Полученные данные в будущем планируется проверить в ходе реального эксперимента, а также произвести компьютерное моделирование связывания с данными лигандами мутантных форм пероксиредоксина 6 человека: с заменами остатков, участвующих в связывании тиоловых соединений, для выявления ключевых аминокислот, необходимых для эффективного взаимодействия глобулы антиоксиданта с восстановителями.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Manevich, S. I. Feinstein, and A. B. Fisher, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 3780 (2004).
2. S. G. Rhee, H. Z. Chae, and K. Kim, Free Radic. Biol. Med. **38**, 1543 (2005).
3. Z. A. Wood, E. Schröder, J. R. Harris, and L. B. Poole, Trends Biochem. Sci. **28**, 32 (2003).
4. H. J. Choi, S. W. Kang, C. H. Yang, et al., Nat. Struct. Biol. **5**, 400 (1998).
5. B. Biteau, J. Labarre, and M. B. Toledano, Nature **425**, 980 (2003).
6. S. W. Kang, S. G. Rhee, T. S. Chang, et al., Trends Mol. Med. **11**, 571 (2005).
7. В. И. Новоселов, И. В. Пешенко, С. В. Новоселов и др., Биофизика **44**, 568 (1999).
8. В. И. Новоселов, Л. М. Барышникова, В. А. Янин и др., Докл. РАН **393**, 412 (2003).
9. A. B. Fisher, C. Dodia, S. I. Feinstein, and Y. S. Ho, J. Lipid Res. **46**, 1248 (2005).
10. E. Kubo, N. Fatma, Y. Akagi, et al., Am J Physiol Cell Physiol, **294**, 842 (2008).
11. A. Kumin, C. Huber, T. Rulicke, et al., Am. J. Pathol. **169**, 1194 (2006).
12. M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, A. E. Gordeeva, et al., Dokl. Biochem. Biophys. **467**, 110 (2016).
13. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., Free Radic. Res. **51** (2), 148 (2017).
14. И. Земцова и Л. Станкевич, Наука в олимпийском спорте, № 2, 37 (2015).
15. М. С. Кондратьев, А. В. Кабанов, В. М. Комаров и др., Биофизика **56** (6), 1045 (2011).

## Virtual Screening of Reducers of Thiol Group for Human Peroxiredoxin 6

M.S. Kondratyev\* and E.V. Zakharova\* \*\*

\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*\*Faculty of Biotechnology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/51, Moscow, 119991 Russia

We conducted a virtual screening of possible thiol reducers for peroxiredoxin 6, which is one of the most important components of the antioxidant system in a number of living organisms, including humans. The mechanism of action of this protein has been already investigated but the search for new reducing agents studying them is still important. According to our hypothesis, not only low-molecular-weight thiol compounds, but also short cysteine-containing peptides can function as reducing agents. In our study, we modeled and analyzed interactions between peroxiredoxin 6 and the following compounds: captopril, unithiol, succimer, cystamine and three cysteine-containing peptide ECESE, KCKCK and CCCCC. Using the methods of molecular modeling and docking, we have identified the most promising molecules for further study. We also discovered a new «atypical» binding site for thiol ligands on the peroxiredoxin 6 molecular surface.

*Keywords: peroxiredoxin, molecular docking, thiolic compounds, reducer, molecular modeling*