

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.213.3

Ускоренная публикация

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ-1 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

© 2011 г. А. Л. Захаренко¹, М. В. Суханова¹, С. Н. Ходырева¹, Ф. Н. Новиков²,
В. С. Стройлов², Д. К. Нилов², Г. Г. Чиллов³, В. К. Шведас^{2,3*}, О. И. Лаврик^{1**}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 22.12.2010 г.

Принята к печати 30.12.2010 г.

Поиск ингибиторов поли(ADP-рибозо)полимеразы-1 (ПАРП1) проведен *in silico* в базе данных химических соединений, затем биологическая активность отобранных соединений проанализирована в экспериментах *in vitro*. Наиболее эффективным методом предсказания ингибиторных свойств химических соединений *in silico* оказался комбинаторный подход, соединяющий технологию молекулярного докинга с последующей структурной фильтрацией результатов. Среди более чем 300 000 низкомолекулярных химических соединений обнаружено 9 ингибиторов ПАРП1; наиболее активные из них: STK031481, STK056130 и STK265022 – оказывали ингибирующий эффект в микромолярной концентрации (значения IC_{50} соответствовали 2.0 мкМ, 1.0 мкМ и 2.6 мкМ).

Ключевые слова: поли(АДФ-рибозо)полимераза-1, ингибиторы поли(АДФ-рибозил)ирования, виртуальный скрининг, молекулярный докинг.

IMPROVED PROCEDURE OF THE SEARCH FOR POLY(ADP-RIBOSE) POLYMERASE-1 POTENTIAL INHIBITORS WITH USE OF MOLECULAR DOCKING APPROACH, by A. L. Zakharenko¹, M. V. Sukhanova¹, S. N. Khodyreva¹, F. N. Novikov², V. S. Stroylov², D. K. Nilov², G. G. Chilov³, V. K. Švedas^{2,3*}, O. I. Lavrik^{1**} (¹Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia, **e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru; ²Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; ³Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: vyta@belozersky.msu.ru). A search for poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors by virtual screening of a chemical compound database and a subsequent experimental verification of their activities have been done. It was shown that the most efficient method to predict inhibitory properties implies a combinatorial approach joining molecular docking capabilities with structural filtration. Among more than 300 000 database chemicals 9 PARP1 inhibitors were revealed; the most active ones, namely: STK031481, STK056130, and STK265022, – displayed biological effect at a micro-molar concentration ($IC_{50} = 2.0 \mu M, 1.0 \mu M$ and $2.6 \mu M$, respectively).

Keywords: poly(ADP-ribose) polymerase-1, inhibitors of poly(ADP-ribosylation), virtual screening, molecular docking.

Поли(ADP-рибозо)полимераза-1 (ПАРП1; КФ 2.4.2.30) – фермент, вовлеченный в ряд клеточных процессов, таких как транскрипция, репликация, репарация ДНК и клеточная смерть. Используя NAD^+ в качестве субстрата, ПАРП1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы), или ПАР. Активация

синтеза ПАР происходит после связывания ферментом поврежденной ДНК [1]. Основной акцептор ПАР – сама ПАРП1, т.е. происходит автополи(ADP-рибозил)ирование. Кроме того, этому виду посттрансляционной модификации могут подвергаться и другие белки, участвующие в метаболизме

Принятые сокращения: ПАРП1 – поли(ADP-рибозо)полимераза-1, ПАР – поли(ADP-рибоза).
Эл. почта: * vyta@belozersky.msu.ru; ** lavrik@niboch.nsc.ru

ДНК, например, гистоны, факторы репарации, транскрипции и репликации ДНК [2]. Одна из важнейших и наиболее изученных функций ПАРП1 – участие в регуляции репарации ДНК. Предполагается, что взаимодействие ПАРП1 с поврежденной ДНК и последующая ее автомодификация могут приводить к активации некоторых систем репарации, а также к сборке репарационной машины в месте повреждения [3–6]. Кроме того, синтез ПАР после повреждения ПАРП1 при связывании с поврежденной ДНК, может служить способом регуляции активности ПАР-связывающих белков, например, вариантных форм гистонов, участвующих в изменении структуры хроматина [7–9].

ПАРП1 рассматривают как многообещающую терапевтическую мишень в онкологии, поскольку функционирование системы репарации может обуславливать устойчивость раковых клеток к химио- и радиотерапии [10, 11]. На сегодняшний день по меньшей мере 8 ингибиторов ПАРП1 проходят клинические испытания, как в качестве монотерапии, так и в сочетании с другими противораковыми препаратами [12]. Однако вопрос о безопасности длительного применения таких препаратов остается открытым, поэтому по-прежнему актуально создание арсенала разнообразных ингибиторов ПАРП1. Кроме того, к настоящему времени открыт ряд других ферментов этого семейства с другими биологическими функциями [13], а это усложняет решение поставленной задачи. Фактически, теперь их две: селективное ингибирование именно ПАРП1 и поиск универсального ингибитора ферментов этого семейства.

В настоящей работе проведена экспериментальная проверка ряда потенциальных ингибиторов ПАРП-1, предсказанных при помощи скрининга коммерческой библиотеки химических соединений методом молекулярного докинга. Также опробована методология структурной фильтрации результатов докинга с целью повышения эффективности предсказания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментальной работе использованы следующие реактивы: маркеры молекулярной массы Rainbow (“Amersham”, США); β -NAD⁺, основные компоненты буферов фирмы “Sigma” или отечественного производства с квалификацией о.с.ч.; [³H]NAD⁺ ОАО фирмы “Изотоп” (Россия).

Полноатомная модель каталитического домена ПАРП1 подготовлена на основе структуры 1efy (PDB ID), выполненной с разрешением 2.2 Å [14]. Виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов проводили с помощью программы Lead Finder 1.1.10 [15] в библиотеке соединений компании Vitas-M Laboratory [16]. Со структурой конкретных соединений можно ознакомиться на сервере ком-

пании (<http://www.vitasmlab.com/>) по идентификационному номеру, указанному в тексте статьи и в таблице.

Константу ингибирования K_i^{calc} рассчитывали на основании расчетного значения энергии связывания ΔG^{calc} по формуле $\Delta G = RT \ln(K_i)$. Значение IC_{50}^{calc} рассчитывали из K_i^{calc} , исходя из соотношения, учитывающего концентрацию NAD⁺ и значение константы Михаэлиса (K_m) для NAD⁺: $K_i = IC_{50}/(1 + [NAD^+]/K_m, \text{NAD}^+)$, где [NAD⁺] – концентрация NAD⁺ в эксперименте.

Рекомбинантный белок ПАРП1 человека (КФ 2.4.2.30) получен как описано в работе Сухановой и др. [17].

Реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования проводили в следующих условиях: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 20 мМ MgCl₂, 150 мМ NaCl, 7 мМ β -меркаптоэтанол, активированная ДНК (2 о.е.₂₈₀/мл, степень активации 25%), 0.6 мМ [³H]NAD⁺ (изотопное разбавление 1 : 500), температура 37°C. Реакцию запускали добавлением ПАРП1 до конечной концентрации 200 нМ и останавливали через 60 с, нанося реакционную смесь на бумажные фильтры (Whatman-1), пропитанные 5%-ным раствором ТХУ. Фильтры отмывали 4 раза в 5%-ной ТХУ, затем в 90%-ном этаноле (для удаления ТХУ) и сушили на воздухе. Количество радиоактивной метки, включенной в кислотонерастворимый продукт, регистрировали на сцинтилляционном счетчике QuantaSmart (“Perkin Elmer”, США). Определение количества радиоактивно-меченого продукта проводили на начальном участке зависимости скорости реакции от времени.

Активность соединений как ингибиторов ПАРП1 оценивали в реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования при концентрации NAD⁺, равной 0.6 мМ. Концентрацию потенциальных ингибиторов варьировали в пределах от 10 нМ до 1 мМ. Реакцию и детекцию продуктов проводили, как описано выше. Значения IC_{50} (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижена на 50% [18]) рассчитывали с помощью программы OriginPro 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распространенной процедурой поиска новых лекарственных препаратов становится виртуальный скрининг: методом молекулярного докинга проверяются большие библиотеки химических соединений с целью выявления наиболее вероятных ингибиторов. В данной работе проведен поиск ингибиторов ПАРП1 в библиотеке химических соединений (более 300000) при помощи молекулярного докинга с использованием программы Lead Finder. По результатам компьютерного скрининга 22 соединения с наиболее высокой расчетной энергией связывания с ПАРП1 были рекомендованы для экс-

Активность соединений, отобранных путем виртуального скрининга, как ингибиторов реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой ПАРП1*

ID	P_{dock}	IC_{50}^{calc} , мкМ	IC_{50}^{exp} , мкМ	Относительная активность ПАРП1**, %
STK056130	1.0	3.91	1.0	
STK031481	0.95	114.68	2.0	
STK265022	1.0	62.09	2.6	
STK059438	1.0	0.18	10.0	
STK041437	1.0	0.08	380	
STK032245	0.9***	476.51	500	
STK217773	1.0	21.61	500	
STK217808	1.0	35.76	500	
STK165584	0.95	3.74	1300	
STK177681	–	0.44		77
STK201275	–	0.53		79
STK279722	–	1.94		81
STK201554	0.25	133.1		85
STK071083	–	513.07		87
STK202130	–	0.18		94
STK215634	–	1.77		95
STK216443	1.0	0.35		95
STK022727	0.1	0.61		98
STK161324	1.0	0.16		99
STK073085	–	0.72		113
STK112669	0.95	0.91		125
STK201163	1.0	0.64		129

* Серым цветом отмечены соединения, удовлетворяющие структурному критерию. P_{dock} – вероятность успешного докирования, IC_{50}^{calc} – расчетное значение IC_{50} , IC_{50}^{exp} – экспериментальное значение IC_{50} .

** Остаточная активность ПАРП1 при концентрации потенциального ингибитора 500 мкМ (подробно см. раздел “Результаты и обсуждение”).

*** Соединение содержит неканонический фармакофор.

периментальной проверки *in vitro*. В таблице представлены результаты анализа отобранных соединений как ингибиторов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Полученные результаты представлены как значения IC_{50} . Параметр IC_{50} не является константой, поскольку зависит от экспериментальных условий, однако исторически он был принят в медицинской литературе как некий количественный показатель ингибирующих свойств соединения [18]. Значение IC_{50} приходится использовать при сравнении ингибирующей активности найденных соединений с известными ингибиторами, поскольку в

большинстве случаев литературные данные по значениям IC_{50} не могут быть пересчитаны в значения констант ингибирования из-за недостаточно полного описания проведенных экспериментов. В тех случаях, когда по причине ограниченной растворимости соединения значение IC_{50} измерить не удалось, мы оценивали активность ПАРП1 при концентрации соединения 500 мкМ и затем рассчитывали так называемую остаточную активность, используя следующую формулу: $100 \times (P_n/P)$, где P_n – количество продукта реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

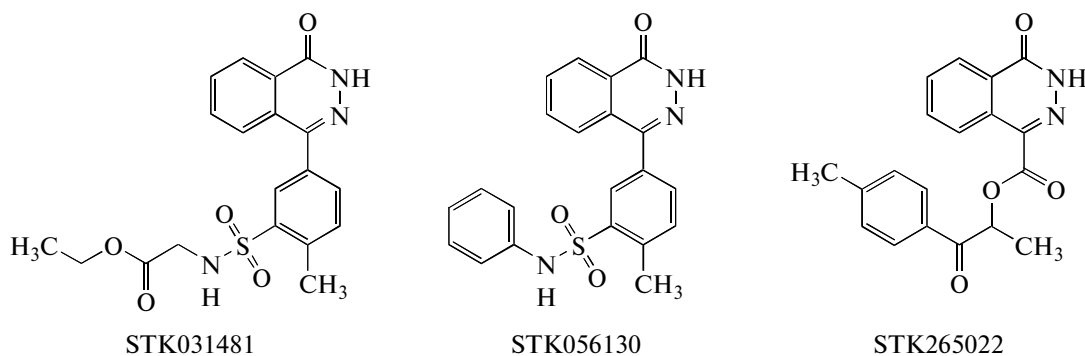


Рис. 1. Структурные формулы соединений – наиболее эффективных ингибиторов поли(ADP-рибозо)полимеразы-1: STK031481 – этиловый эфир N-([2-метил-5-(4-оксо-3,4-дигидрофталазин-1-ил)фенил]сульфонил)глицина ($IC_{50} = 2.0$ мкМ); STK056130 – 2-метил-5-(4-оксо-3,4-дигидрофталазин-1-ил)-N-фенилбензолсульфонамид ($IC_{50} = 1.0$ мкМ); STK265022 – 1-(4-метилфенил)-1-оксопропан-2-ил-4-оксо-3,4-дигидрофталазин-1-карбоксилат ($IC_{50} = 2.6$ мкМ).

зил)ирования в присутствии соединения *n*, а *P* – в его отсутствии.

В результате анализа *in vitro* 22-х соединений, отобранных при виртуальном скрининге, показано, что 9 из них ингибируют реакцию поли(ADP-рибозил)ирования. Наилучшее совпадение расчетных и экспериментальных характеристик получено для двух соединений: STK056130 и STK032245 (отношение экспериментально полученного IC_{50} к расчетному соответствует 3.9 и 0.95). Лучшими ингибиторами реакции поли(ADP-рибозил)ирования оказались соединения STK056130, STK031481 и STK265022 ($IC_{50} = 1.0, 2.0$ и 2.6 мкМ соответственно), молекулы которых содержат бициклический фталазиновый фрагмент (рис. 1). Этот же фрагмент входит в состав соединений-кандидатов в лекарственные препараты, которые либо проходят испытания *in vitro* и *in vivo* [19], либо уже включены в клинические испытания [20].

Следует заметить, что предсказание 13 соединений как потенциальных ингибиторов ПАРП1 оказалось ошибочным: программа докинга дала завышенное значение энергии связывания. С целью по-

высить эффективность прогнозирования *in silico* мы ввели дополнительную стадию скрининга – структурную фильтрацию результатов молекулярного докинга. Это методика, позволяющая отсеивать ложноположительные результаты моделирования [21]. Анализ доступных кристаллографических структур ПАРП1 (PDB ID: 1efy, 1rax, 2rax, 3rax, 4rax, 2gsw, 2rd6, 1uk0, 1uk1 и 1wok) показал, что для эффективных ингибиторов характерно образование водородных связей между лактамной группой фармакофора и остатком Gly863 ПАРП1 (рис. 2). Именно эту особенность мы использовали при создании структурного фильтра в качестве критерия корректности связывания ингибитора. Для каждого из 22 лигандов проведено 20 запусков докинга, при этом вероятность успешного докирования P_{dock} определяли как отношение числа запусков с успешным результатом (удовлетворяющим структурному критерию) к общему числу запусков, т.е. $P_{dock} = N_{усп}/20$. При использовании структурного фильтра исключали соединения с $P_{dock} \leq 0.25$, что позволило отсеять 9 из 13 ложноположительных ингибиторов.

Экспериментальная проверка ингибирующих свойств потенциальных ингибиторов ПАРП1, отобранных в результате компьютерного скрининга библиотеки 300000 химических соединений, позволила оценить эффективность выбранной методологии моделирования. Программа докинга Lead Finder показывает хорошие результаты: 9 из 22 рекомендованных лигандов проявили активность в микромолярном–миллимолярном диапазоне концентраций *in vitro*. Применение вспомогательного метода – структурной фильтрации результатов докинга – позволило отсеять большинство ложноположительных результатов моделирования и, таким образом, увеличить точность предсказания. Опробованный в работе комбинаторный подход, объединяющий возможности методов молекулярного докинга и структурной фильтрации, будет использо-

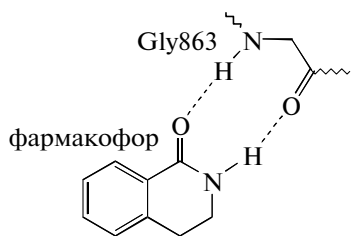


Рис. 2. Схематическое изображение характерных взаимодействий между фармакофором эффективных ингибиторов, приведенных на рис. 1, и остатком Gly863 активного центра поли(ADP-рибозо)полимеразы-1.

ван нами в дальнейшем для поиска новых ингибиторов ПАРП1.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проекты 10-04-01083 и 09-04-91320), Междисциплинарным интеграционным проектом Сибирского отделения РАН №104, а также Программой РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chambon P., Weill J.D., Mandel P. 1963. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 39–43.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**, 249–268.
- Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S. 1996. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular ‘nick-sensor’ *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4387–4394.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3563–3571.
- Godon C., Cordelières F.P., Biard D., Giocanti N., Mégnin-Chanet F., Hall J., Favaudon V. 2008. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4454–4464.
- Суханова М.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. 2004. Поли(АДФ-рибозо)полимераза-1 – регулятор белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах, возникающих при генотоксическом воздействии. *Молекуляр. биология*, **38**, 834–847.
- Timinszky G., Till S., Hassa P.O., Hothorn M., Kustatscher G., Nijmeijer B., Colombelli J., Altmeyer M., Stelzer E.H., Scheffzek K., Hottiger M.O., Ladurner A.G. 2009. A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 923–929.
- Ahel D., Horejsi Z., Wiechens N., Polo S.E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S.C., Jackson S.P., Owen-Hughes T., Boulton S.J. 2009. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science*. **325**, 1240–1243.
- Gottschalk A.J., Timinszky G., Kong S.E., Jin J., Cai Y., Swanson S.K., Washburn M.P., Florens L., Ladurner A.G., Conaway J.W., Conaway R.C. 2009. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 13770–13774.
- Gatti L., Zunino F. 2005. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods Mol. Med.* **111**, 127–148.
- Borst P., Rottenberg S., Jonkers J. 2008. How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell Cycle*. **7**, 1353–1359.
- Drew Y., Plummer R. 2009. PARP inhibitors in cancer therapy: Two modes of attack on the cancer cell widening the clinical applications. *Drug Resist. Updat.* **12**, 153–156.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 517–528.
- White A.W., Almasy R., Calvert A.H., Curtin N.J., Griffin R.J., Hostomsky Z., Maegley K., Newell D.R., Srinivasan S., Golding B.T. 2000. Resistance-modifying agents. 9. Synthesis and biological properties of benzimidazole inhibitors of the DNA repair enzyme poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Med. Chem.* **43**, 4084–4097.
- Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. 2008. Lead finder: an approach to improve accuracy of protein-ligand docking, binding energy estimation, and virtual screening. *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 2371–2385.
- STK library. 2007. Vitas-M Laboratory. <http://www.vitasmmlab.com/>
- Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. 2004. Поли(АДФ-рибоза) полимеразы I ингибирует синтез ДНК с вытеснением цепи, катализируемый ДНК полимеразой β. *Биохимия*. **69**, 686–698.
- Neubig R.R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A. 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **55**, 597–606
- Kamanaka Y., Kondo K., Ikeda Y., Kamoshima W., Kitajima T., Suzuki Y., Nakamura Y., Umemura K. 2004. Neuroprotective effects of ONO-1924H, an inhibitor of poly ADP-ribose polymerase (PARP), on cytotoxicity of PC12 cells and ischemic cerebral damage. *Life Sci.* **76**, 151–162.
- Menear K.A., Adcock C., Boulter R., Cockcroft X.L., Copley L., Cranston A., Dillon K.J., Drzewiecki J., Garman S., Gomez S., Javaid H., Kerrigan F., Knights C., Lau A., Loh V.M.Jr., Matthews I.T., Moore S., O'Connor M.J., Smith G.C., Martin N.M. 2008. 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Med. Chem.* **51**, 6581–6591.
- Novikov F.N., Stroylov V.S., Stroganov O.V., Chilov G.G. 2010. Improving performance of docking-based virtual screening by structural filtration. *J. Mol. Model.* **16**, 1223–1230.