

УДК 544.341.2.001.24

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА ARS-1620 С БЕЛКОМ KRAS^{G12C} МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

А.М. Кулакова^{1,2*}, Т.М. Захарова¹, Ф.Д. Мулашкин¹, Е.О. Терехова^{2,3},
М.Г. Хренова^{1,4}

(¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; ²Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН; ³Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева; ⁴ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; *e-mail: kulakova@lcc.chem.msu.ru)

Представлены результаты определения константы диссоциации комплекса фермента KRAS, имеющего онкогенную мутацию G12C, с потенциальным ингибитором передачи клеточного сигнала ARS-1620. Значение константы диссоциации, оцененное методом молекулярного докинга, составило 280 нМ. Применение более точного метода молекулярной динамики с использованием техники перекрещивающихся распределений позволило получить оценку 0,3±0,1 нМ.

Ключевые слова: RAS, ARS-1620, молекулярный докинг, молекулярная динамика, H-REUS.

Белки семейства RAS относятся к классу малых ГТФаз, катализирующих гидролиз гуанозинтрифосфата (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ). Интерес исследователей к этому классу белков вызван их участием в передаче клеточных сигналов, отвечающих за рост и деление клеток. Белки RAS представляют собой молекулярные переключатели и могут находиться в двух состояниях: активном и неактивном. В активном состоянии белки RAS передают клеточный сигнал и чаще всего находятся в состоянии, связанном с ГТФ. Комплекс RAS с ГДФ находится в неактивном состоянии. Переключение между состояниями в направлении активации сигнала происходит с помощью факторов нуклеотидного обмена (GEF), обеспечивающих замену ГДФ на ГТФ в белке RAS. Переключение между состояниями в направлении прекращения передачи сигнала происходит непосредственно за счет ферментативного гидролиза ГТФ до ГДФ, который нередко ускоряется белками, активирующими ГТФазы (GAP) [1].

Мутации в белках семейства RAS характерны для 30% случаев раковых заболеваний у человека, поскольку способствуют постоянному пребыванию белка в активном состоянии [2]. При нормальном функционировании белки RAS регулируют пролиферацию клеток, устойчивость к апоптозу и метастазирование опухолей. Ряд точечных мутаций приводит к нарушению отрицательной сигнализации, и клетки начинают непрерывно размножаться, образуя раковую

опухоль. В связи с этим актуальным становится поиск соединений, способных стабилизировать неактивное состояние белков RAS.

Белки семейства RAS имеют достаточно гладкую поверхность и не содержат энергетически выгодных центров связывания, поэтому на сегодняшний день не существует терапевтических препаратов, способных переводить их в неактивное состояние [2]. Для стабилизации неактивного состояния белка RAS пытались использовать как малые молекулы, связывающиеся в его активном центре [3], так и полипептиды, и антитела, имеющие большую площадь контакта с белком [4, 5]. Дизайн малых молекул, способных связываться в активном центре белка, не дает желаемых результатов, поскольку сложно подобрать молекулу, имеющую сродство к белку значительно большее, чем нуклеотиды ГТФ и ГДФ.

Более перспективное направление в поиске стабилизатора неактивного состояния RAS – поиск аллостерических ингибиторов. Среди таких веществ наиболее важными оказались соединения, связывающиеся в S-IIP-кармане белка RAS [6–8]. Данный карман был обнаружен несколько лет назад в ходе поиска ковалентных ингибиторов белка KRAS с заменой аминокислотного остатка глицина в 12-м положении на цистеин (KRAS^{G12C}), что подтверждено молекулярно-динамическими расчетами [6]. В кристаллических структурах нативных белков и белков без лигандов, связывающихся в данной области, S-IIP-

кармана не наблюдается, поскольку его размер и форма определяются наличием лиганда в этой полости и его стабилизирующими свойствами. S-ИП-карман располагается близко к карману связывания нуклеотидов по другую сторону от аминокислотного остатка Cys12, он образован аминокислотными остатками центрального бета-листа β_1 и альфа-спиралей α_2 и α_3 [6].

В недавних исследованиях [7] показано, что соединение ARS-853 селективно связывается с белком KRAS, имеющим онкогенную мутацию G12C, и стабилизирует его неактивную форму. Однако такое соединение оказалось неустойчивым *in vivo* и было модифицировано до более совершенного соединения ARS-1620, которое показывает лучшую химическую и метаболическую стабильность с сохранением селективности по отношению к KRAS^{G12C} и может применяться при исследовании живых организмов [8].

В данной работе с помощью методов молекулярного моделирования изучен процесс нековалентного связывания соединения ARS-1620 с ферментом KRAS^{G12C}. Для оценки константы дис-

социации комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 выбраны два разных подхода:

- 1) метод молекулярного докинга;
- 2) метод молекулярной динамики с использованием техники перекрещивающихся распределений (H-REUS) [9].

Результаты и их обсуждение

В качестве начальной структуры для расчетов использовали кристалл комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 (PDB ID 5V9U) [8], достроенный до полноатомной модели. Молекулярный докинг проводили с помощью генетического алгоритма Ламарка, реализованного в программном пакете Autodock [10]. Использование приближения жесткий белок – гибкий лиганд позволяет изменять конформацию лиганда только посредством изменения торсионных углов, поэтому для улучшения результатов докинга была проведена предварительная оптимизация геометрии ARS-1620 (рис. 1) методом теории функционала электронной плотности в варианте Кона–Шэма B3LYP/6-31G** в программ-

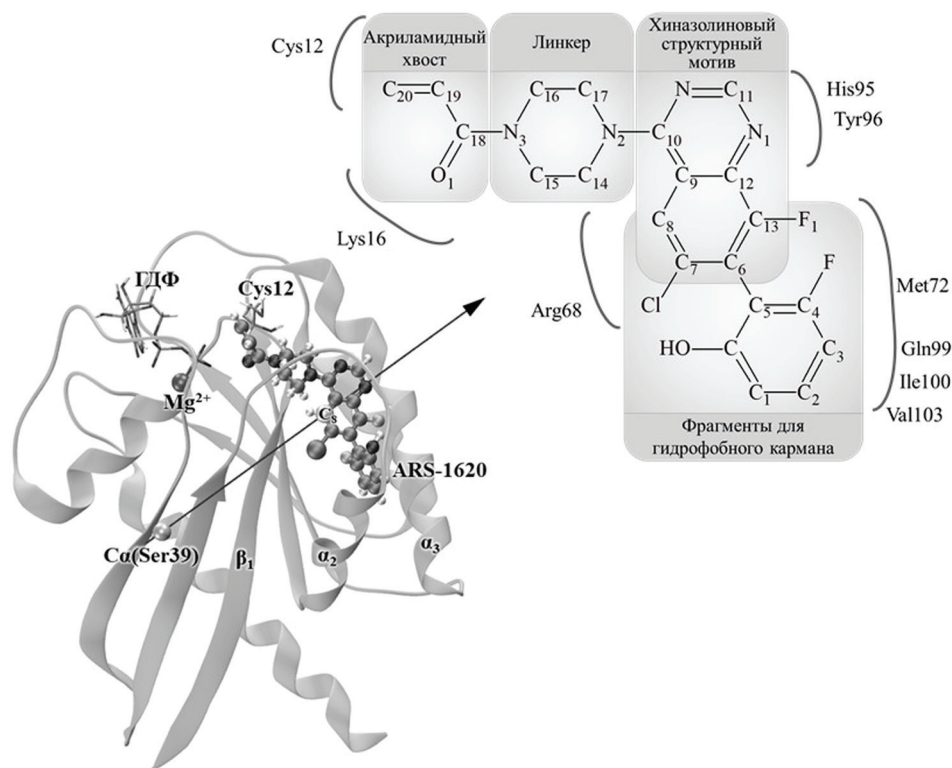


Рис. 1. Слева положение соединения ARS-1620 в кармане связывания S-ИП белка KRAS^{G12C} (PDB ID 5V9U). Шаростержневой моделью представлено соединение ARS-1620, стержневой моделью – ГДФ и Cys12. Ван-дер-Ваальсовыми сферами представлены катион магния и атомы, определяющие направление выхода лиганда в раствор. Направление выхода лиганда в раствор обозначено стрелкой. Справа строение соединения ARS-1620 и его положение в S-ИП-кармане белка KRAS^{G12C}

ном пакете GAMESS [11]. Оценочная функция программы Autodock основана на силовом поле AMBER, хорошо оценивающем энергетические параметры и геометрические характеристики белковых систем.

Конформационный поиск положения лиганда проводили по всей поверхности белка. Наилучшее значение оценочной функции соответствует положению лиганда в кармане связывания S-ИП, аналогичному положению лиганда в кристалле комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 (RMSD = 3,6 Å). 2-Гидрокси-6-фторбензольный фрагмент находится в гидрофобной части кармана, образованной аминокислотными остатками Met72, Ile100, Val103, а также алкильными фрагментами аминокислотных остатков Arg68 и Gln99. Хинозалиновый структурный мотив образует π -стэкинг-взаимодействие с Tyr96. Акриламидный «хвост» ARS-1620 находится на расстоянии 3 Å от атома серы Cys12 и образует водородную связь атомом O₁ с аминокислотным остатком Lys16. Оценка стандартной энергии Гиббса связывания ARS-1620 в S-ИП-кармане, полученная методом молекулярного докинга, составила –9 ккал/моль. Данное значение может быть преобразовано в константу диссоциации комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 с помощью уравнения

$$\Delta G_{\text{dis}}^0 = -RT \ln K_{\text{dis}}.$$

Значение константы диссоциации, оцененное методом молекулярного докинга, составило 280 нМ.

Для оценки константы диссоциации комплекса ARS-1620 с KRAS^{G12C} методом молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений было проведено моделирование процесса выхода лиганда в раствор. Для расчета указанным методом полноатомная модель кристалла комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 была сольватирована молекулами воды таким образом, чтобы расстояние от любого атома комплекса до границ ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда составляло не менее 15 Å, и чтобы обеспечивалась возможность полного выхода лиганда в раствор. Далее в систему были добавлены катионы натрия для нейтрализации общего заряда. Общий размер системы, содержащей 37871 атом, составил 70×76×74 Å³. Белок KRAS^{G12C} описывался набором параметров силового поля CHARMM36 [12], соединения ARS-1620 и ГДФ – параметрами CGenFF [13], а молекулы воды – параметрами TIP3P [14].

Метод молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений (Hamiltonian replica-exchange umbrella sampling method) заключается в параллельном моделировании нескольких копий системы с ограничивающими гармоническими потенциалами вдоль выбранной координаты реакции, которые при определенных условиях могут периодически обмениваться своими координатами [9]. Моделирование проведено в программном пакете NAMD [15], в качестве координаты реакции выбран вектор, соединяющий C_α-атом Ser39 и C₈-атом соединения ARS-1620 (рис. 1). Всего моделировали 14 параллельных копий системы с центрами ограничивающих гармонических потенциалов, соответствующих расстояниям C_α (Ser39) – C₈ (ARS-1620) от 15,0 до 33,2 Å с интервалом в 1,4 Å. Начальные геометрии для каждой копии системы были получены из предварительного моделирования методом направленной молекулярной динамики [16]. Копии системы обменивались координатами каждые 100 фс. В ходе моделирования было рассчитано 0,21 мкс молекулярно-динамической траектории, по 15 нс для каждой копии системы. На рис. 2 представлен профиль стандартной энергии Гиббса для исследуемого процесса и показана сходимость результатов при увеличении длины молекулярно-динамических траекторий.

Для получения значения константы диссоциации комплекса KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620 исходя из профиля свободной энергии процесса выхода ARS-1620 в раствор был проанализирован набор молекулярно-динамических траекторий, содержащих последние 13 нс траектории для каждой системы, с помощью метода анализа взвешенных гистограмм (WHAM) [17], реализованного в программном пакете Grossfield Lab WHAM [18]. Статистические ошибки оценены методом анализа ошибок Монте-Карло (Monte Carlo Bootstrap Error Analysis), основанного на многократной генерации выборок методом Монте-Карло на базе имеющейся выборки, и реализованного в программном пакете Grossfield Lab WHAM [18].

На рис. 2 представлен профиль поверхности стандартной энергии Гиббса выхода соединения ARS-1620 в раствор. В области малых значений координаты реакции локализован ярко выраженный минимум, соответствующий связанному состоянию системы KRAS^{G12C}·ГДФ·ARS-1620. В области больших значений координаты реакции есть минимум при значении координаты реакции 24 Å, который отвечает частично-связанно-

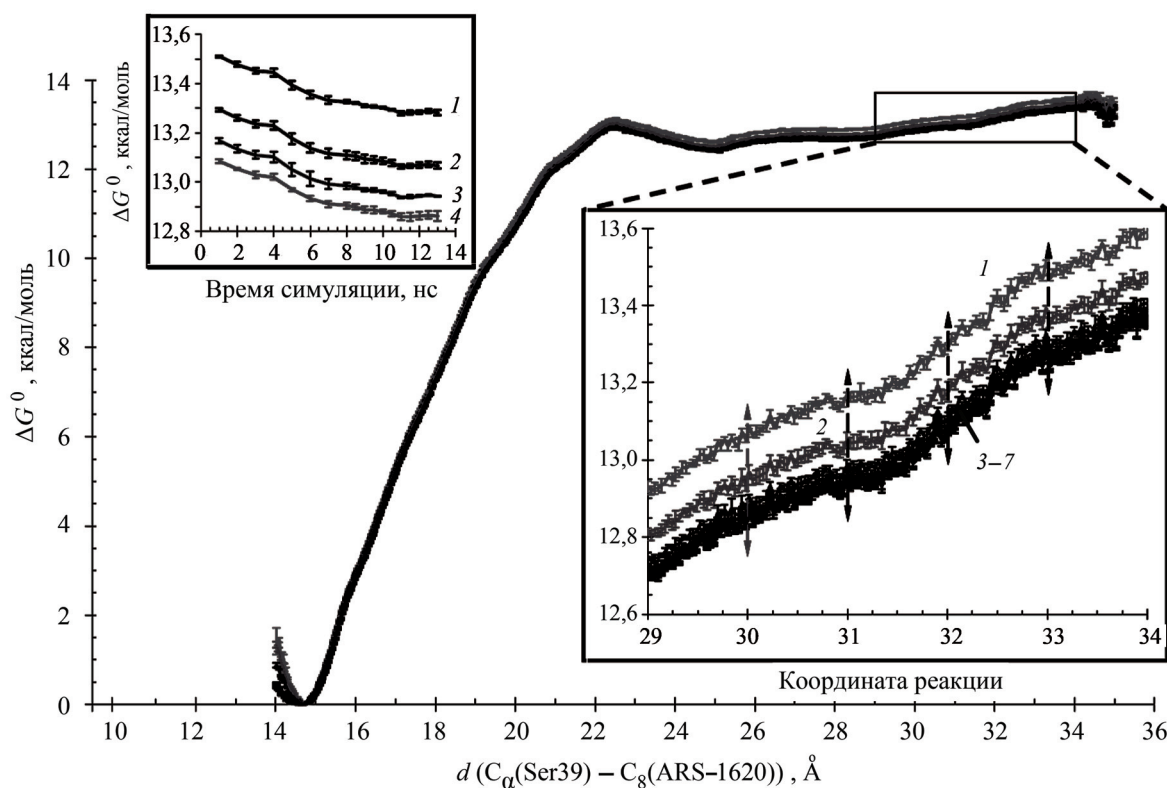


Рис. 2. Профиль поверхности стандартной энергии Гиббса выхода соединения ARS-1620 в раствор из S-ПП-кармана белка KRAS^{G12C}, оцененный методом анализа взвешенных гистограмм на основе моделирования методом молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений. Доверительный интервал оценивали с помощью метода анализа ошибок Монте-Карло. На врезке справа профиль поверхности стандартной энергии Гиббса в области свободного лиганда (время симуляции, нс: 1 – 1,0; 2 – 5,0; 3 – 8,0; 4 – 10,0; 5 – 12,0; 6 – 12,5; 7 – 13,0). На врезке слева зависимость стандартной энергии Гиббса от времени моделирования для систем с разными значениями координаты реакции, Å: 1 – 30; 2 – 31; 3 – 32; 4 – 33

му состоянию. Область, отвечающая свободному лиганду в растворе, имеет значение координаты реакции более 30 Å. Поэтому оценку стандартной энергии Гиббса процесса рассчитывали как разность среднего значения стандартной энергии Гиббса в интервале координаты реакции 30–33 Å и значения стандартной энергии Гиббса в минимуме, соответствующем связанному состоянию лиганда. Стандартная энергия Гиббса процесса выхода ARS-1620 в раствор, оцененная методом молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений, составила $13,1 \pm 0,2$ ккал/моль. Соответствующее ей значение константы диссоциации комплекса ARS-1620 с белком KRAS^{G12C} при $T = 298$ К составило $0,3 \pm 0,1$ нМ.

Заключение

Сравнение полученных результатов показывает, что использование значительно менее ресурсозатратного метода молекулярного докин-

га приводит к завышению значения константы диссоциации комплекса ARS-1620 с белком KRAS^{G12C} за счет недооценки свободной энергии связывания лиганда с белком, которая обусловлена тем, что расстояние от атома N₁ хи-назолинового фрагмента ARS-1620 до атома N_ε His95 KRAS^{G12C} в методе молекулярного докинга больше, чем в методе молекулярной динамики с применением техники перекрещивающихся распределений.

Работа частично поддержана Российским научным фондом (проект № 19-73-20032, Е.О. Терехова) и выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [19].

Конфликта интересов нет.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. // *Nature*. 1991. Vol. 349. P. 117 (DOI: 10.1038/349117a0).
2. Cox A.D., Fesik S.W., Kimmelman A.C., Luo J., Der C.J. // *Nature Rev. Drug Discovery*. 2014. Vol. 13. P. 828 (DOI: 10.1038/nrd4389).
3. Hunter J.C.; Gurbani D., Ficarro S.B. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111. P. 8895 (DOI: 10.1073/pnas.1404639111).
4. Sogabe S., Kamada Y., Miwa M. et al. // *ACS Med. Chem. Lett.* 2017. Vol. 8. P. 732 (DOI: 10.1021/acsmchemlett.7b00128).
5. Spencer-Smith R., Koide A., Zhou Y. et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. Vol. 13. P. 62 (DOI: 10.1038/nchembio.2231).
6. Ostrem J.M., Peters U., Sos M.L., Wells J.A., Shokat K.M. // *Nature*. 2013. Vol. 503. P. 548 (DOI: 10.1038/nature12796).
7. Patricelli M.P., Janes M.R., Li L.-S. et al. // *Cancer Discov.* 2016. Vol. 6. P. 316 (DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-1105).
8. Janes M.R., Zhang J., Li L.-S. et al. // *Cell*. 2018. Vol. 172. P. 578 (DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.006).
9. Earl D.J., Deem M.W. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005. Vol. 7. P. 3910 (DOI: 10.1039/B509983H).
10. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30. P. 2785 (DOI: 10.1002/jcc.21256).
11. Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A. et al. // *J. Comput. Chem.* 1993. Vol. 14. P. 1347 (DOI: 10.1002/jcc.540141112).
12. Yu W., He X., Vanommeslaeghe K., MacKerell A.D. // *J. Comput. Chem.* 2012. Vol. 33. P. 2451 (DOI: 10.1002/jcc.23067).
13. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al. // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31. P. 671 (DOI: 10.1002/jcc.21367).
14. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al. // *J. Chem. Phys.* 1983. Vol. 79. P. 926 (DOI: 10.1063/1.445869).
15. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26. P. 1781 (DOI: 10.1002/jcc.20289).
16. Isralewitz B., Baudry J., Gullingsrud J., Kosztin D., Schulten K. // *J. Mol. Graph. Model.* 2001. Vol. 19. P. 13 (DOI: 10.1016/S1093-3263(00)00133-9).
17. Kumar S., Rosenberg J.M., Bouzida D., Swendsen R.H., Kollman P.A. // *J. Comput. Chem.* 1992. Vol. 13. P. 1011.
18. Grossfield A. WHAM: the weighted histogram analysis method <http://membrane.urmc.rochester.edu/content/wham>.
19. Voevodin V., Antonov A., Nikitenko D. et al. // *Supercomput. Front. Innov.* 2019. Vol. 6. P. 4 (DOI: 10.14529/jsfi190201).

Поступила в редакцию 10.09.2019

Получена после доработки 12.10.2019

Принята к публикации 14.11.2019

ESTIMATION OF DISSOCIATION CONSTANT OF ARS-1620 COMPLEX WITH KRAS^{G12C} PROTEIN BY MOLECULAR MODELING

A.M. Kulakova^{1,2}, T.M. Zakharova¹, F.D. Mulashkin¹, E.O. Terekhova^{2,3}, M.G. Khrenova^{1,4}

(¹ Lomonosov Moscow State University; ² Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences; ³ D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; ⁴ Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences; *e-mail: kulakova@lcc.chem.msu.ru; *e-mail: kulakova@lcc.chem.msu.ru)

The paper presents the results of the estimation of KRAS^{G12C}-GDP-ARS-1620 complex dissociation constant. The ARS-1620 is a potential inhibitor of cellular signal transduction of KRAS enzyme with the oncogenic mutation G12C. Dissociation constant value estimated by molecular docking is 280 nM and 0.3±0.1 nM within the molecular dynamics combined with the Hamilton replica exchange umbrella sampling approach.

Key words: RAS, ARS-1620, molecular docking, molecular dynamics, H-REUS.

Сведения об авторах: Кулакова Анна Михайловна – мл. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kulakova@lcc.chem.msu.ru); Захарова Татьяна Максимовна – студентка лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (tatdetekt18@gmail.com); Мулашкин Фёдор Дмитриевич – студент лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (fedor.mulashkin@gmail.com); Терехова Екатерина Олеговна – мл. науч. сотр. лаборатории компьютерного моделирования биомолекулярных систем и наноматериалов ИБХФ РАН, аспирант кафедры квантовой химии Института химии и проблем устойчивого развития РХТУ им. Д.И. Менделеева (katerin.terekhova@gmail.com); Хренова Мария Григорьевна – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; вед. науч. сотр., руководитель группы молекулярного моделирования ФИЦ Биотехнологии РАН; докт. физ.-матем. наук (wasabiko@lcc.chem.msu.ru).