

Р.Г. Ефремов: Как осуществляли молекулярный докинг: методика выбора решений, оценочная функция и ее калибровка, кластеризация, ранжирование и пр.

А.А. Чеблов: 1) Молекулярный докинг проводили в программе Molsof ICM Pro. Методика расчетов подробно описана в статье проф. Р.А.Абагяна (Neves, M. A., Totrov, M., & Abagyan, R. (2012). Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. Journal of computer-aided molecular design, 26(6), 675-686). Вкратце, для белковой части используется силовое поле ЕСЕРР/3, для лиганда MMFF. В задаваемом сайте связывания строится набор сетчатых карт потенциалов, учитывающих гидрофобные, ван-дер-ваальсовы, электростатические взаимодействия и возможность образовывать водородные связи. Проводится предварительный анализ пространства возможных конформаций лиганда. Наиболее энергетически выходные конформации лиганда используются в качестве стартовых для докинга на построенных сетках. Докинг проводится методом Монте-Карло со смещением выбора величин двугранных углов лиганда в наиболее заселённые разрешённые области. После каждого шага Монте-Карло проводится локальная минимизация свободной энергии. Каждая найденная поза лиганда оценивается с помощью функции, учитывающей вклад семи составляющих, взятых с различными весовыми коэффициентами, полученными параметризацией на широком спектре соединений: 1) сумма ван-дер-ваальсовых взаимодействий лиганда с рецептором и конформационной энергии лиганда, 2) изменение свободной энергии, связанное с потерей подвижности при связывании лиганда, 3) изменении энергии образования водородных связей, 4) потеря энергии, связанная с дегидратацией доноров и акцепторов водородной связи, 5) изменение электростатической составляющей энергии гидратации, 6) изменение энергии гидрофобных взаимодействий и 7) слагаемое, пропорциональное размеру лиганда. Для каждой из найденных поз можно провести уточнение с учётом подвижности боковых цепей аминокислотных остатков белка.

Р.Г. Ефремов: Существуют ли какие-нибудь экспериментальные данные (мутагенез и пр.), подтверждающие функциональную роль предложенных новых сайтов связывания?

А.А. Чеблов: На сегодняшний день хорошо изучено связывание в активном центре глюкоцереброзидазы известных конкурентных ингибиторов – миметиков глюкозы и их производных; подтверждена активация мутантных форм ГЦ такими молекулами. Методами скрининга на фибробластах и макрофагах пациентов с болезнью Гоше обнаружено два фармакологических шаперона, не являющихся конкурентными ингибиторами. Сайты связывания этих молекул неизвестны, экспериментальных работ по их выявлению не проводилось. В представленной работе мы попытались найти возможные сайты связывания одного из соединений – NCGC00188758 (N58).

Р.Г. Ефремов: Расчет свободной энергии связывания (ddG) с помощью МД – нетривиальная задача, обычно решаемая методами теории возмущений (термодинамическое интегрирование и пр.) Как именно рассчитывали ddG: выбор координаты реакции, число «окон», сходимость и т.д.? Калибровали ли подход на соединениях с известными из эксперимента значениями ddG?

А.А. Чеблов: На данном этапе работы нас интересовала разница в аффинности связывания N58 в различных потенциальных сайтах на поверхности фермента. Поэтому мы рассчитывали относительную свободную энергию связывания dG более простым, чем термодинамическое интегрирование, методом MM/GBSA. Для сравнения, рассчитанная нами тем же методом свободная энергия связывания изофагомина в активном центре ГЦ составляет $-20,2 \pm 2,5$ ккал/моль. Калибровку расчётов не проводили.

Р.Г. Ефремов: Каковы (кратко) выводы по результатам докинга? Можно ли в структуре лиганда выделить значимый фармакофор(ы)? Если да, то насколько они похожи/отличаются для разных сайтов? Есть ли сходные фармакофоры среди соединений с экспериментально установленной активностью?

А.А. Чеблов: Выделить фармакофор не удалось, но во всех трёх выявленных потенциальных сайтах, характеризующихся наименьшей свободной энергией связывания, N58 находится в конформации, где образуется внутримолекулярная водородная связь между NH-группой анилида

и N атомом пиразольного кольца пиразолопиримидина. N58 пытается максимально убрать свою большую гидрофобную поверхность от взаимодействий с водой. Наименьшая энергия связывания наблюдается в глубоких карманах, где у N58 наружу обращены два полярных атома азота пиразолопиримидина. Поиск альтернативных молекул можно проводить среди гидрофобных претендентов, обладающих продолговатой формой.

Р.Г. Ефремов: Расшифровку «БГ» лучше дать на слайде 2.

А.А. Чеблоков: Благодарю за замечание.