СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР МГУ ИМ. ЛОМОНОСОВА ШКОЛА-ИНТЕРНАТ ИМ. КОЛМОГОРОВА

Курсовая работа

на тему «Поиск потенциальных ингибиторов к кинетохорному белку Ndc80»

Выполнила:

ученица 10 «Н» класса СУНЦ МГУ им. Ломоносова Дарья Александровна Бахарева

Научные руководители:

аспирант Химического факультета МГУ им. Ломоносова Геннадий Иванович Макаров

аспирант Факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. Ломоносова Владимир Константинович Аржаник

Оглавление

| I. | Введение | 3 |
|-----|---|------------|
| II. | . Обзор литературы | 4 |
| | 1. Клеточный цикл | 4 |
| | 2. Контрольная точка сборки веретена делания (SAC) | 7 |
| | 3. Препараты, оказывающие действие на микротрубочки | 9 |
| III | I. Результаты и обсуждения | 10 |
| | 1. Исследование структуры комплекса Ndc80 и выбор сайта для | связывания |
| | потенциального ингибитора | 10 |
| | 2. Предсказание структурной формулы потенциального ингибито | ра методом |
| | эволюции низкомолекулярных лигандов | 10 |
| | 3. Рациональная доработка полученного соединения и проверка док | кингом11 |
| IV | ⁷ . Методы | 13 |
| v. | Выводы | 14 |
| VI | I. Литепятупя | 15 |

I. Введение

Проблема онкологических заболеваний остается приоритетной для современного общества. По прогнозам ВОЗ заболеваемость и смертность онкологическими заболеваниями во всем мире возрастет в 2 раза за период с 1999 года по 2020 год: с 10 до 20 млн. новых случаев и с 6 до 12 млн. регистрируемых смертей. [12] Чтобы избежать этого, ведется активная разработка противораковых препаратов разного спектра действия.

Одним из способов борьбы с развитием злокачественного новообразования является применение препаратов, угнетающих деление клеток - цитостатиков. При этом рост новообразования замедляется, давая время для применения иных методов лечения. Кроме того, в некоторых случаях аварийная остановка клеточного деления может приводить к апоптозу - запрограммированному самоуничтожению клетки. В этом случае злокачественное новообразование не только прекратит расти, но и будет уменьшаться, снижая опухолевую нагрузку на организм. Примером препаратов, подавляющих клеточное деление, являются алкалоиды барвинка, ингибирующие сборку митотических микротрубочек.

Перспективной мишенью для разработки новых цитостатиков является кинетохорный белок Ndc80, непосредственно соединяющий кинетохор митотической хромосомы с митотической микротрубочкой, взаимодействуя с образующим последнюю белком тубулином. Соединение, обладающее способностью подавлять взаимодействие белка Ndc80 и тубулина, будет нарушать связывание микротрубочки с кинетохором митотической хромосомы, приводя к аресту анафазы и, как следствие, остановке клеточного деления. Это, в свою очередь, может приводить к апоптозу клетки, деление которой было остановлено таким образом. Следовательно, такое соединение может быть противораковым препаратом.

Данная исследовательская работа направлена на поиск низкомолекулярного соединения, подавляющего взаимодействие между белком Ndc80 тубулином. На основе такого соединения возможно создать новое семейство противораковых препаратов для эффективной борьбы с онкологическими заболеваниями. В ходе работы предполагается изучить комплекс Ndc80 с тубулином, чтобы задать сайт связывания лиганда, разработать методами виртуальной эволюции и докинга структуру низкомолекулярного вещества, которое подавляло бы связывание комплекса Ndc80 и тубулина микротрубочек, рационально доработать полученную структуру и проверить ее докингом.

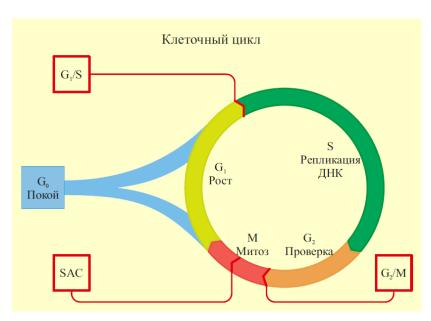
II. Литературный обзор

1. Клеточный цикл.

Клеточный цикл – последовательность событий, происходящих между образованием данной клетки и её делением на дочерние клетки. Этот цикл состоит из трех главных стадий:

Интерфаза - период интенсивного синтеза и роста. В клетке синтезируются множество веществ, необходимых для её роста и осуществления всех свойственных ей функций. Эта стадия, в свою очередь, обычно подразделяют на три периода:

- Пресинтетический период (G1-фаза, от англ. Gap интервал). В этот период происходят интенсивные процессы биосинтеза, образование митохондрий, хлоропластов (у растений), эндоплазматического ретикулума, лизосом, аппарата Гольджи, рибосом, вакуолей и пузырьков. Ядрышко продуцирует рРНК, мРНК, тРНК. Клетка синтезирует структурные и функциональные белки, подготавливается к удвоению хромосом. Этот период характеризуется продолжительностью и интенсивным ростом клетки.
- Синтемический период (S-фаза, от англ. Synthesis синтез). В течение этого периода продолжается синтез РНК и белков, происходит удвоение хромосом (репликация ДНК); каждая хромосома оказывается удвоенной (состоит из двух сестринских хромотид).
- *Постинетический период* (G2-фаза). В данный период клетка готовится к делению: синтезируются белки микротрубочек, которые будут формировать веретено деления, запасается энергия.



Фазы клеточного цикла эукариотической клетки (рис.1)

Кроме перечисленных периодов выделяют ещё G-фазу, или фазу покоя, в которую клетка входит из G1-фазы при недостатке питательных веществ, неподходящих условиях среды или отсутствии сигналов к делению. Например,

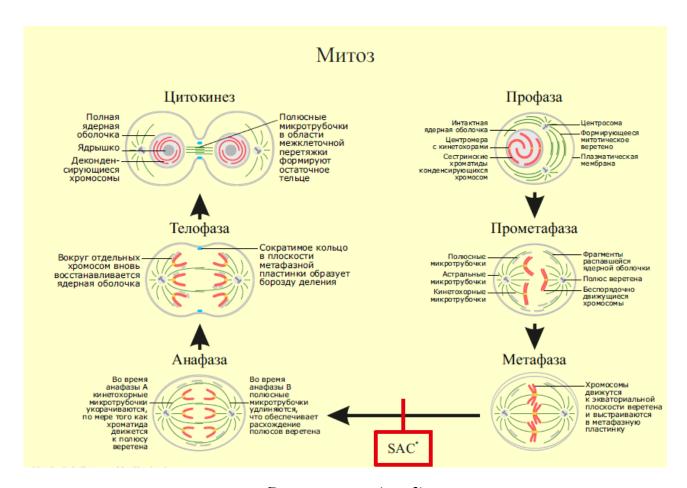
большинство дифференцированных клеток в тканях многоклеточных организмах находятся в фазе покоя всю свою жизнь, если только им не придет сигнал делиться. Если же условия среды стали подходящими для размножения или получен сигнал делиться, клетка выходит из фазы покоя обратно в G1-фазу. Продвижение клетки по клеточному циклу управляется тремя проверочными точками: первая, G1/S, нужна чтобы удостовериться, подходят ли условия среды для деления, на второй, G2/M, проверяется, приемлемы ли ещё условия среды, удвоилась ли ДНК и цела ли она, третья же контрольная точка преодолевается клеткой в ходе митоза.

Митоз (кариокинез) – деление клеточного ядра, при котором образуются два дочерних ядра с наборами хромосом, идентичными наборам родительской клетки. В митозе выделяют следующие фазы:

- *Профаза* (первая фаза деления) обычно самая продолжительная фаза клеточного деления, в процессе которой хроматиды укорачиваются и утолщаются в результате их спирализации и конденсации; в животных клетках и у низших растений центриоли расходятся к противоположным полюсам клетки. От каждой центриоли в виде лучей расходятся короткие микротрубочки. Ядрышки уменьшаются, а ядерная мембрана распадается.
- Прометафаза. В ходе этой фазы хромосомы оказываются в цитоплазме, далее скрепляются с астральными микротрубочками своими кинетохорами и колеблются между полюсами деления, пока не займут центральное положение в клетке. Кинетохор сложный белковый комплекс, функциональная роль которого заключается в связывании между собой сестринских хроматид, в закреплении митотических микротрубочек, в регуляции разъединения хромосом и в собственно движении хромосом во время митоза при участии микротрубочек.
- *Метафаза* (фаза скопления хромосом) начинается тогда, когда хромосомы наконец займут положение ровно между полюсами деления, как бы на экваторе клетки, образовав метафазную пластинку. Сестринские хромосомы при этом закреплены кинетохорами на микротрубочках, отходящих от противоположных полюсов деления, кинетохоры развернуты каждый к своему полюсу. Хромосомы в метафазе окончательно обособляются друг от друга, соприкасаясь друг с другом единственно центромерами. Количество микротрубочек становится наивысшим относительно остальных фаз митоза.
- *Анафаза* (фаза расхождения хромосом) стадия, во время которой сестринские хроматиды, ставшие самостоятельными хромосомами, расходятся к полюсам.

- Движение хромосом, как и в прометафазе, обеспечивается взаимодействием центромерных районов хромосом с микротрубочками веретена деления.
- *Телофаза* (фаза окончания деления), в ходе которой хромосомы достигают полюсов клетки, деспирализируются, удлиняются. Нити веретена разрушаются, а центриоли реплицируются. Вокруг хромосом на каждом из полюсов образуется ядерная оболочка; формируются ядрышки.

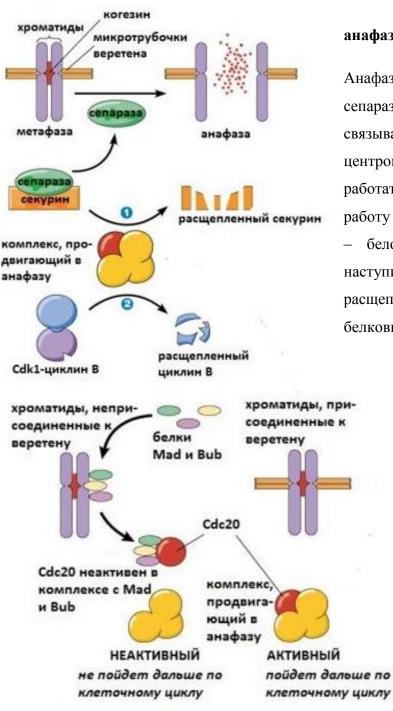
Цитокинез – процесс разделения цитоплазмы между двумя дочерними клетками. В растительных и грибных клетках на месте расположения метафазных хромосом начинает строиться клеточная стенка, разделяющая дочерние клетки. Животные клетки делятся путем перетяжки.



Стадии митоза (рис.2)

2. Контрольная точка сборки веретена деления (SAC).

Как было сказано раннее, в ходе клеточного цикла клетка проходит через точки контроля, всего таких точек три: G1/S, G2/M и SAC. SAC - контрольная точка сборки веретена деления, находящаяся на границе метафазы и анафазы. Здесь проверяется прикрепление хромосом к нитям веретена. Для нормального прохождения митоза очень важно, чтобы все кинетохоры всех хроматид были прикреплены к нитям митотического веретена. Если это не выполнится, то у дочерних клеток будет неправильный набор хромосом.



Роль комплекса АРС в запуске анафазы (рис.3)

Анафаза начинается с того, что фермент сепараза разрезает когезин, который районе связывал две хроматиды центромер. Чтобы сепараза не начала работать преждевременно, в метафазе её работу блокирует специальный ингибитор белок секурин. Для того, чтобы наступила анафаза, секурин необходимо расщепить. Это расщепление запускает белковый комплекс APC (ot англ. anaphase-promoting complex -

комплекс, продвигающий в анафазу).

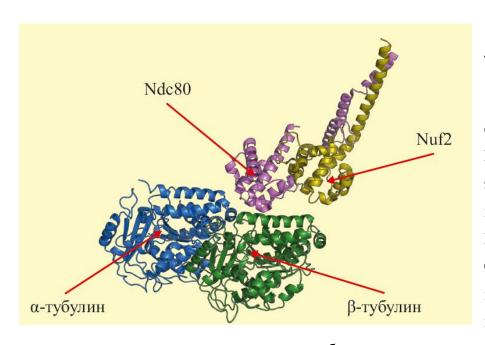
Регуляция активности комплекса APC с кинетохорами. (рис.4)

Следовательно, до тех пор, пока хоть один кинетохор не связан с микротрубочкой от полюса веретена, комплекс АРС должен быть неактивен – клетка не должна вступать в анафазу.

Как только все хроматиды связались с митотическим веретеном, АРС активируется.

С кинетохорами, к которым не прикреплены микротрубочки, связываются белки Маd и Вub. Они собираются в сложный комплекс, после чего отделяются от кинетохора и связывают белок Cdc20. Этот белок является необходимым компонентом комплекса APC, без которого последний нефункционален. Благодаря этому, если в клетке есть «пустые», не связанные с микротрубочками кинетохоры, то комплекс APC будет неактивен, и клетка не перейдет в анафазу. Когда все кинетохоры свяжутся с нитями веретена, комплексы белков Мad и Вub перестанут образовываться, белок Cdc20 освободится от них и войдет в состав комплекса APC, APC вызовет расшепление секурина, тот перестанет блокировать работу сепаразы, она расшепит когезин, хроматиды станут расходиться, и клетка вступит в анафазу. [4].

Если же клетка долго не проходит эту контрольную точку сборки веретена деления, то она впадает в апоптоз. Это происходит в случае сильного нарушения взаимодействия кинетохора с микротрубочкой. Когда же это происходит?



Комплекс Ndc80 с тубулином (рис. 5)

В первых сведениях о комплексе Ndc 80 установлено, что этот белок человеческих клеток кодируется геном HEC (Highly Expressed in Cancer) и как-то связан с процессом деления клетки: введение в клетку

антител к нему вызывает множественные сбои при расхождении хромосом. [5] Оказалось, что Ndc 80 работает не один, а в комплексе с тремя другими белками – Nuf2, Spc24 и Spc25. [6] Позже выяснили, что именно комплекс Ndc 80 передает сигнал о на расхождение хромосом сигнальным киназам, обрывающим клеточный цикл. [7] Согласно современным представлениям, именно комплекс Ndc 80 служит своеобразным переходником между микротрубочкой и кинетохором, причём белки Ndc 80 и Nuf2 связываются с микротрубочкой, а белки Spc24, Spc25 – с кинетохором. Между собой комплекс Ndc 80 скрепляется за счет образования двойных спиралей альфа-спиральными С-концевыми доменами Ndc 80 и Nuf2 и

N-концевыми доменами Spc24, Spc25. [8] Связывание Ndc 80 с белком тубулином микротрубочек кооперативно, и обеспечивается как избирательным взаимным узнаванием, так и электростатическим взаимодействием положительно заряженного глобулярного домена Ndc 80 и отрицательно заряженного тубулина. Поэтому сила взаимодействия комплекса Ndc 80 с микротрубочкой регулируется фосфорилированием белка Ndc 80. [9] Известно, что подавление производства белка Nuf2 замедляет рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы и, более того, вызывает их апоптоз. [10]

Очевидно, что подавление сборки комплекса Ndc 80 или подавление его связывания с кинетохором или микротрубочкой будет приводить к остановке клеточного деления, и, возможно, к апоптозу.[11]

3. Препараты, оказывающие действие на микротрубочки.

Апоптоз является одним из механизмов запрограммированной клеточной смерти, в результате которого клетка распадается на отдельные апоптотические тельца, ограниченные плазматической мембраной. Фрагменты погибшей клетки обычно очень макрофагами, либо быстро фагоцитируются соседними клетками, минуя развитие воспалительной реакции. Апоптоз выполняет ряд важных функций: формирование органов в эмбриогенезе, ликвидация ненужных органов в эмбриогенезе, контроль числа клеток в организме, уничтожение дефектных и вредных клеток. В последнее время выясняется и ещё одна роль, которую выполняет апоптоз в нашей жизни. По-видимому, он является важнейшим барьером на пути превращения нормальной клетки в раковую. Получен ряд данных, свидетельствующих о том, что если клетки начнут входить в S-фазу клеточного цикла, не получив сигнала от рецептора фактора роста, то запускается программа апоптоза, защищающая организм от вышедших из-под контроля клеток.[4]

В настоящее время уже созданы препараты, оказывающие действие на микротрубочки и ведущие к остановке деления клетки:

• *Ингибиторы сборки микротрубочек* связываются со специфическими участками на тубулине, ингибируя сборку тубулина в микротрубочки, тем самым вызывая арест митоза в метафазе. К препаратам такого типа относят нокодазол, алкалоиды барвинка, колхицин, винкаалколоиды (включают винбластин и винкристин) и др.

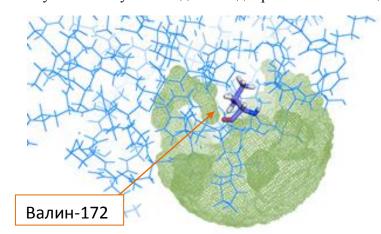
• *Стабилизаторы микротрубочек* подавляют пересборку микротрубочек в процессе деления, вызывая также арест митоза в метафазе или возврат в G2-фазу. Такими препаратами являются паклитаксел (таксол), доцетаксел и др.

Но данные препараты являются нейротоксичными. Поэтому на сегодняшний день разработка препаратов, оказывающих действие на микротрубочки, является актуальной.

III. Результаты и обсуждения.

1. <u>Исследование структуры комплекса Ndc80 и выбор сайта для</u> <u>связывания потенциального ингибитора.</u>

В качестве структуры комплекса Ndc80 для поиска ингибитора я выбрала структуру с кодом PDB 2VE7, в которой белок Ndc80 связан с тубулином микротрубочки. Именно к этому комплексу необходимо подобрать такой лиганд, который бы мог связаться с ним, тем

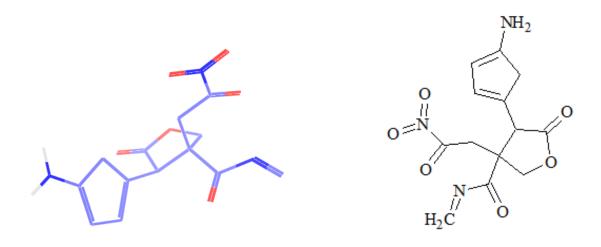


самым препятствуя соединению с микротрубочкой. Это, в свою очередь, приведет к аресту анафазы и, как следствие, клеточной смерти (апоптозу). В качестве сайта связывания была выбрана полость Ndc80, находящаяся рядом с валином-172.

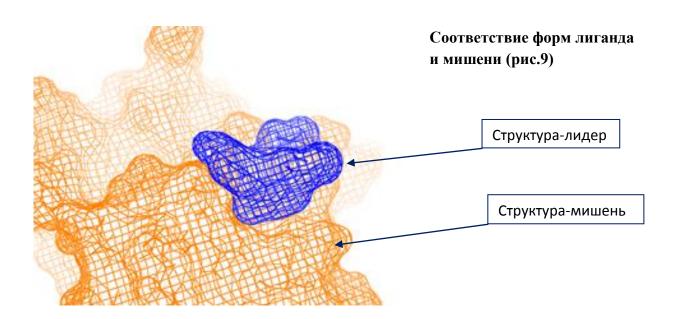
Подсчет полости для связывания потенциального ингибитора (рис.6).

2. Предсказание структурной формулы потенциального ингибитора методом эволюции низкомолекулярных лигандов.

К выбранной структуре я подбирала потенциально связывающееся соединения, используя метод эволюции низкомолекулярных лигандов. Результатом этой операции стало соединение-лидер, обладающее наилучшим сродством по предсказанию программы rDock (см. Методы).



Структура с наивысшим сродством, получившаяся в ходе эволюции низкомолекулярных лигандов. (рис.7,8)

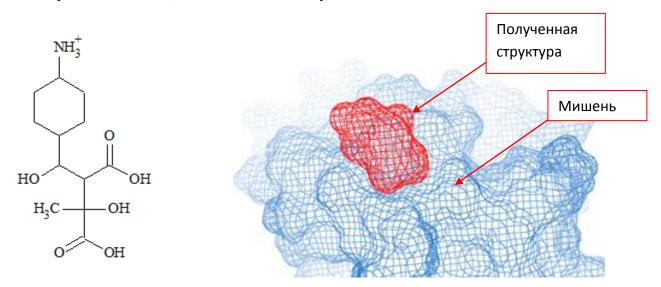


3. Рациональная доработка полученного соединения и проверка докингом.

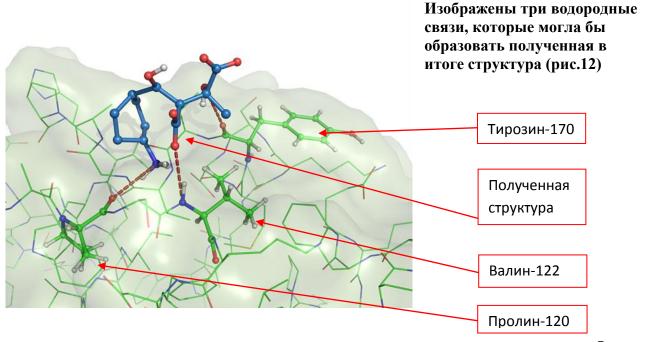
Следующим этапом моей работы являлась рациональная доработка полученного в ходе виртуальной эволюции соединения-лидера. Использованная в настоящей работе реализация метода виртуальной эволюции низкомолекулярных лигандов не может гарантированно построить структуру соединения, полностью соответствующего законам химии и удовлетворяющего требованиям органического синтеза, вследствие чего необходима рациональная доработка его результатов человеком, направленная на изменение структуры вещества таким образом, чтобы оно соответствовало законам химии, обладало

достаточно устойчивой конфигурацией, легко синтезировалось, а также хорошо связывалось с мишенью. Для достижения такого результата я, основываясь на предсказании структуры комплекса докингом, выделила наиболее существенные для связывания фрагменты структуры соединения-лидера и оставила их без изменения, заменив при этом пятичленные циклы на более устойчивые шестичленные и упростив общую структурную формулу соединения, удалив элементы, мало участвующие в связывании, затем составила библиотеку возможных структур и проверила их докингом.

В ходе проверки докингом уже рационально доработанных соединений были получены структуры, обладающие разными степенями сродства со структурой мишени. Из них было выбрано соединение, наиболее соответствующее мишени.



Структурная формула полученного Соответствие форм лиганда и мишени соединения (рис.10) (рис.11)



Стр. 12

Данная структура могла бы образовывать ряд межмолекулярных взаимодействий с мишенью, такие как: водородные связи, ван-дер-ваальсовые взаимодействия, а также хорошо бы соответствовала выбранной полости.

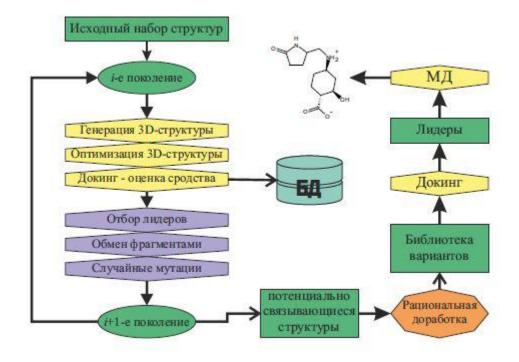
Уровень сродства данного соединения (-27,9) является вполне удовлетворительным результатом выполненной работы, сопоставим со значением сродства антибиотика линезолида к бактериальной рибосоме(-33,0), по указанию моего научного руководителя Г.И. Макарова.

Следует отметить, что данное соединение будет усовершенствовано в дальнейших исследованиях.

IV. Методы

В ходе своего исследования я использовала следующие методы:

• Виртуальная эволюция низкомолекулярных лигандов в реализации моего научного руководителя Г.И. Макарова. Этот метод основан на объединении генетических алгоритмов и докинга и заключается в следующем: из набора случайных структур простых органических молекул составляется начальная популяция, для каждого из входящих в неё соединений получается оптимизированная пространственная структура и для неё методом докинга предсказывается сродство к мишени, затем из полученной популяции отбирается часть соединений, обладающих наивысшим сродством к выбранному сайту, далее происходит обмен фрагментами между ними (скрещивание) и внесение случайных изменений (мутаций), таким образом, формируется новая популяция, которая вовлекается в следующий цикл виртуальной эволюции.



Эволюция низкомолекулярных лигандов (рис.13)

- *Молекулярный докинг* метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой. Этим методом я воспользовалась с помощью пакета rDock.
- Метод докинга использовался как для предсказания структуры комплекса лигандмишень и оценки сродства к мишени на стадии виртуальной эволюции, так и при последующей рациональной доработке результатов эволюции. В последнем случае происходило изменение мной структуры соединения для облегчения синтеза, увеличения соответствия мишени и придания устойчивости, включавшее добавление или удаление функциональных групп для улучшения связывания. Таким образом, создавалась библиотека вариантов изменяемой структуры, проверявшаяся докингом.

V. Выводы.

- Выбран потенциальный сайт связывания ингибитора образования комплекса Ndc80 с тубулином.
- Методами виртуальной эволюции низкомолекулярных лигандов и докинга получена возможная структура ингибитора кинетохорного белка Ndc80.

VI. Список используемой литературы.

- [1] Alberts B. et al. Essential cell biology. Garland Science, 2013.
- [2] Тейлор Д., Грин Н., Стаут У. Биология в трех томах. (том 3) М.: Мир, 2007.
- [3] Высоцкая Л. В. и др. Общая биология: учебник для 10-11 классов с углубленным изучением биологии» под редакцией ВК Шумного //ЛВ Высоцкая, СМ Глаголев, ГМ Дымшиц. -М.: просвещение. 2001.
- [4] Ченцов Ю. С. Введение в клеточную биологию: Общая цитология //Москва: Академкнига. – 2005.
- [5] Chen Y. et al. HEC, a novel nuclear protein rich in leucine heptad repeats specifically involved in mitosis //Molecular and cellular biology. − 1997. − T. 17. − №. 10. − C. 6049-6056.
- [6]Wigge P. A., Kilmartin J. V. The Ndc80p complex from Saccharomyces cerevisiae contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation //The Journal of cell biology. − 2001. − T. 152. − №. 2. − C. 349-360.
- [7] Martin-Lluesma S., Stucke V. M., Nigg E. A. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2 //Science. − 2002. − T. 297. − №. 5590. − C. 2267-2270.
- [8] Guimaraes G. J. et al. Kinetochore-microtubule attachment relies on the disordered N-terminal tail domain of Hec1 //Current biology. -2008. -T. 18. -N. 22. -C. 1778-1784.
- [9]Foley E. A., Kapoor T. M. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore //Nature reviews Molecular cell biology. − 2013. − T. 14. − №. 1. − C. 25-37.
- [10]Liu Q. et al. Silencing of NUF2 Inhibits Tumor Growth and Induces Apoptosis in Human Hepatocellular Carcinomas //Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2013. T. 15. №. 20. C. 8623-8629.
- [11]Orticello M. et al. N-terminus-modified Hec1 suppresses tumour growth by interfering with kinetochore–microtubule dynamics //Oncogene. 2014.
- [12] http://humbio.ru/humbio/01122001/canc_sv/00046f3d.htm (07.04.2016)