

УДК 547.92.057

©Коллектив авторов

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 17(20)Z- И 17(20)E- ПРЕГНА-5,17(20)-ДИЕН-21-ОИЛАМИДОВ С ЯДЕРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ LXR β

*И.В. Федюшкина, С.В. Стулов, Н.О. Дугин, А.Ю. Мишарин, А.Р. Мехтиева,
Г.Е. Морозевич, А.В. Веселовский**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
“Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича” Российской академии медицинских наук,
Москва, Погодинская ул., д. 10; тел.: 499-245-0768; факс: 499-245-0857;
эл. почта: veselov@ibmh.msk.su

В работе проведен анализ новых восьми изомерных 17(20)Z- и 17(20)E-прегна-5,17(20)-диен-21-оиламидов, различающихся структурой амидного фрагмента, которые являются конформационно жесткими аналогами оксистеринов. Анализ низкоэнергетических конформеров показал, что все 17(20)E-изомеры имеют три основных энергетических минимума (со значениями двугранного угла $\theta_{20,21}$ (C17=C20-C21=O) $\sim 0^\circ$, $\sim 120^\circ$ и $\sim 240^\circ$), из которых наиболее заселённым является минимум, соответствующий значению $\theta_{20,21} \sim 0^\circ$; тогда как 17(20)Z-изомеры характеризуются наличием одного или двух пулов устойчивых конформаций. Молекулярный докинг этих соединений в участок связывания лиганда ядерного рецептора LXR β (потенциальной мишени) показал возможность связывания E-изомеров и отсутствие таковой для Z-изомеров. Результаты молекулярного моделирования подтверждены экспериментом, в котором продемонстрирован стимулирующий эффект одного соединения – 17(20)E-3 β -гидроксипрегна-5,17(20)-диен-21-оил-(гидроксиэтил)амида на биосинтез триглицеридов в клетках Hep G2.

Ключевые слова: прегна-5,17(20)-диен-21-оиламиды, докинг, LXR, ядерный рецептор, биосинтез триглицеридов, Hep G2.

ВВЕДЕНИЕ. Продукты окислительного метаболизма холестерина – стерины, гидроксилированные в боковой цепи, включая 24(S)-гидроксихолестерин (цереб्रोостерол), 25-гидроксихолестерин, 27-гидроксихолестерин, являются важнейшими регуляторными молекулами в организме млекопитающих. Эти оксистерины контролируют гомеостаз липидов, холестерина, глюкозы, клеточную дифференцировку и пролиферацию, а также развитие и функционирование клеток центральной нервной системы [1-8]. Многие синтетические стерины и их производные, содержащие полярные заместители

* - адресат для переписки

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРЕГНА-5,17(20)-ДИЕН-21-ОИЛАМИДОВ С LXR

в боковой цепи, эффективно влияют на транскрипцию генов ключевых ферментов биосинтеза стерина и триглицеридов в культуре клеток млекопитающих [1-3, 9-15]. Участие оксистерина и их аналогов в процессах биосинтеза, метаболизма и транспорта липидов в значительной степени обусловлено их взаимодействием с ядерными рецепторами LXR α и LXR β .

Изучение лиганд-рецепторных комплексов LXR α и LXR β с оксистеринами и их аналогами [13, 14, 16, 17] показало, что определяющую роль играет наличие в молекуле лиганда 3 β -гидроксила и второй полярной группы (гидрокси-, эпокси-, кето-, сложноэфирной, амидной) в боковой цепи, способной к образованию водородной связи и служащей “якорем” для связывания с рецептором. Стереохимическая конфигурация полярной группы и её положение в боковой цепи определяет сродство и специфичность оксистерина или его аналога к рецептору [13, 14].

Разработанный недавно новый синтез прегна-5,17(20)-диен-21-оиламидов [18, 19] позволяет легко получать соединения, структурно близкие к биологически активным оксистеринам. Очевидно, что структурные исследования и прогноз биологической активности для этих синтетических аналогов оксистерина представляет интерес.

Целью данной работы был расчёт устойчивых конформаций для восьми новых изомерных 17(20)*Z*- и 17(20)*E*-прегна-5,17(20)-диен-21-оиламидов, содержащих одну, две и три гидроксиметильных группы в амидном фрагменте, моделирование взаимодействия этих соединений с их потенциальной биологической мишенью – ядерным рецептором LXR β , а также проверка результатов моделирования в эксперименте на культуре клеток.

МЕТОДИКА.

Молекулярное моделирование. Синтез и характеристика новых азотсодержащих аналогов оксистерина описаны в работах [18-20]. Структурные формулы изучаемых в работе соединений приведены на рисунке 1. Расчёт устойчивых конформаций молекул проводили методом стохастического конформационного поиска с использованием программы RandomSearch в составе программы Sybyl8.1 (Tripos Inc., США). Параметры расчёта: максимальное число циклов 5000, “отсечка” по энергии между конформерами – 3,0 ккал/моль, порог RMS – 0,2 ангстрем, максимальное число конформеров – 20.

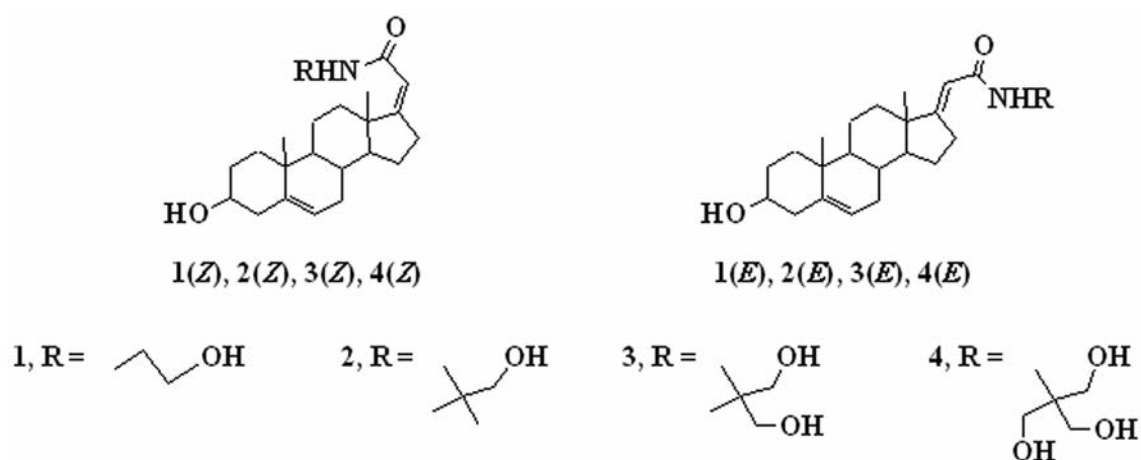


Рисунок 1.

Структурные формулы исследованных соединений.

В работе использовали пространственную структуру лиганд-связывающего домена LXR β полученную из базы данных пространственных структур макромолекул PDB (код 1P8D). Структуры низкомолекулярных соединений были построены при помощи программы SYBYL 8.1 (Tripos Inc., США). Оптимизацию структур соединений и белка проводили методом минимизации энергии по методу Пауэлла с использованием силового поля Tripos в вакууме. Значения парциальных атомных зарядов рассчитывали методом Gasteiger-Huckel.

Моделирование взаимодействия низкомолекулярных соединений с участком связывания лиганд-связывающего домена LXR β (код pdb 1P8D) проводили с использованием программы молекулярного докинга DOCK 6.5 (США). Поверхность, доступная для растворителя на мишени для докинга была рассчитана по алгоритму Конолли с пробным радиусом равным 1,4 Å. Поля для электростатического потенциала и потенциала Ван дер Ваальса мишени были генерированы на решетке в шагом 0,3 Å; “отсечка” для нековалентных взаимодействий равнялась 12,0 Å. Отбор комплексов проводили по величинам оценочной функции Dock. За правильное расположение лиганда принимали конформации, для которых среднеквадратичное отклонение (RMSD) не превышало 1,5 Å по сравнению с природным агонистом 24(S)-24,25-эпоксистероидом в структуре 1P8D.

Клетки Hep G2. Клетки гепатомы человека линии Hep G2 (ECACC) культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClon, Великобритания), в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Перед экспериментом клетки выдерживали 24 ч в бессывороточной среде. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в растворе этанола (содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 1,0%).

Влияние исследуемых соединений на липогенез [21]. Клетки Hep G2 в шестилуночных планшетах инкубировали 14 ч в присутствии исследуемых соединений в концентрации 5 мкМ, или в присутствии 25-гидроксистероидина (положительный контроль) в концентрации 2 мкМ, затем в среду добавляли 0,1 мМ [1-¹⁴C]AcONa (1 мкКи на 1 мл среды) и продолжали инкубацию ещё 4 ч. Клетки трижды промывали PBS, липиды экстрагировали смесью гексан-*i*PrOH (3:2) и разделяли ТСХ в системе гексан-Et₂O-AcOH (85:14:1) в присутствии внутренних стандартов (холестерина, триолеина, олеиновой кислоты); после проявления фракций в парах иода, зоны соскабливали и проводили измерение радиоактивности в толуольном сцинтилляторе на счётчике Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer, США). Уровень биосинтеза триглицеридов (имп./мин/ 1 мг клеточного белка за 4 ч) рассчитывали по включению радиоактивной метки. Каждое определение проводили в трех повторах в трёх независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Изомерные 17(20)*Z*- и 17(20)*E*-прегна-5,17(20)-диен-21-оиламиды можно рассматривать как конформационно жесткие аналоги оксистероидов, поскольку наличие 17(20)-двойной связи и её сопряжение с амидной группой должно определять положение амидного фрагмента относительно стероидного цикла. Амидные фрагменты не содержат хиральных атомов, поэтому конфигурация заместителей при 17(20) двойной связи и количество гидроксиметильных групп в амидном фрагменте должны полностью детерминировать набор устойчивых конформаций этих соединений. Рассчитанные энергетически выгодные конформации соединений 1(*Z*), 1(*E*), 2(*Z*), 2(*E*), 3(*Z*), 3(*E*), 4(*Z*), 4(*E*), представлены на рисунке 2.

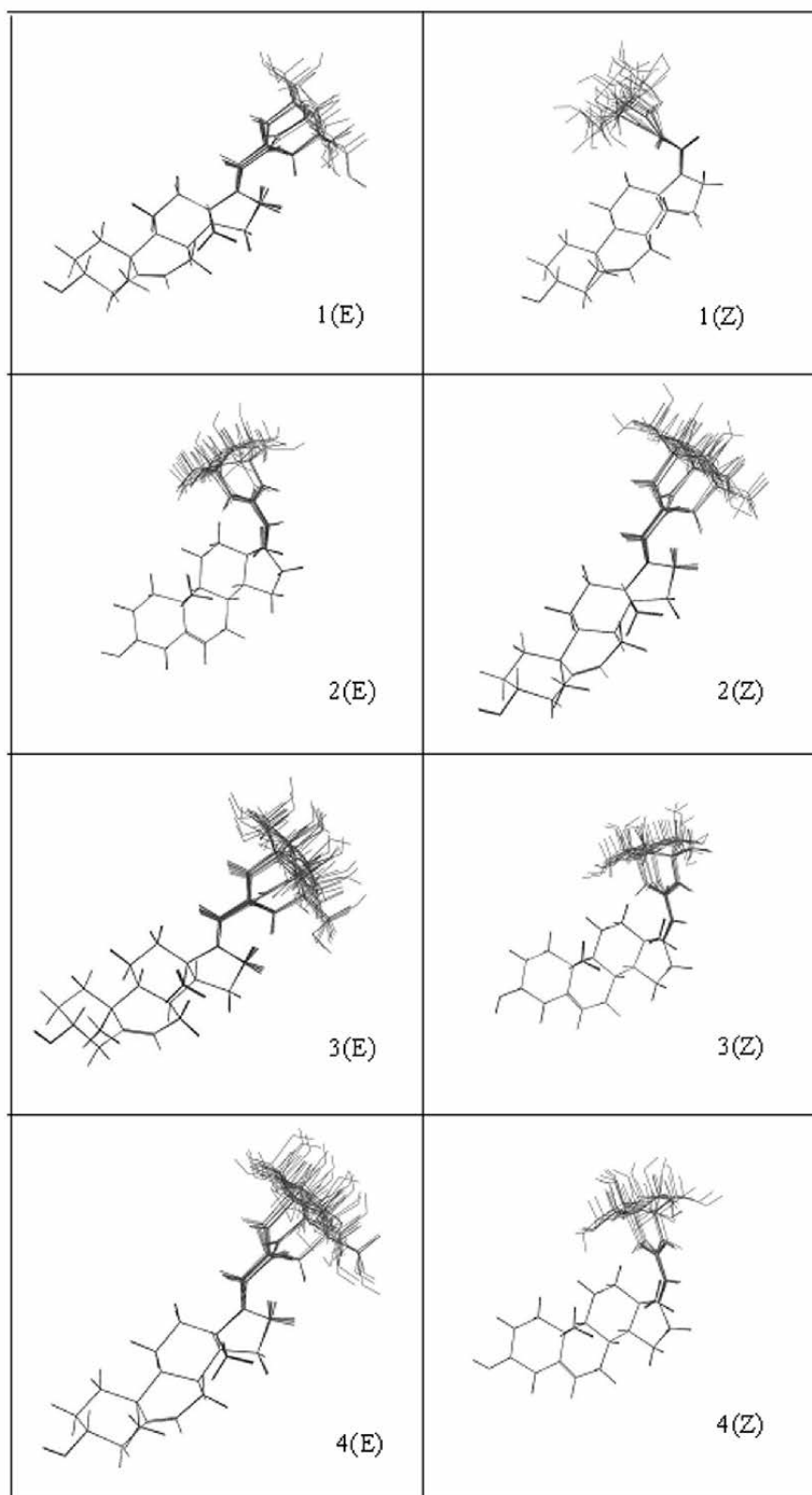


Рисунок 2.

Наборы энергетически выгодных конформеров для соединений 1(Z), 1(E), 2(Z), 2(E), 3(Z), 3(E), 4(Z), 4(E).

Для соединения **1(Z)** был получен только один кластер устойчивых конформеров, соответствующий значению двугранного угла $C17=C20-C21=O$ ($\theta_{20,21}$) $\sim 90^\circ$. Для соединений **2(Z)**, **3(Z)** и **4(Z)** было показано наличие двух основных энергетических минимумов, соответствующих значениям $\theta_{20,21} \sim 90^\circ$ и $\sim 270^\circ$. В наиболее заселённом пуле заместители в амидном фрагменте были развёрнуты в β -область ($\theta_{20,21} \sim 270^\circ$). Для всех 17(20)*E*-изомеров рассчитано три основных энергетических минимума ($\theta_{20,21} \sim 0^\circ$, $\sim 120^\circ$ и $\sim 240^\circ$), из которых наиболее заселённым является минимум, соответствующий значению $\theta_{20,21} \sim 0^\circ$. Сопоставление наборов энергетически выгодных конформеров для каждой из пар 17(20)*Z*- и 17(20)*E*-изомеров позволяет заключить, что для всех пар отсутствуют конформеры, в которых дистальная гидроксильная группа занимала бы одинаковое положение относительно стероидного цикла.

Чтобы оценить возможность активации LXR синтезированными соединениями был проведен молекулярный докинг в место связывания лиганд-связывающего домена ядерного рецептора LXR β (pdb 1P8D) [16, 17] (рис. 3). Результаты докинга исследуемых соединений мы сравнивали со структурой комплекса природного агониста LXR 24(*S*)-24,25-эпоксихолестерина (код pdb 1P8D). За правильное расположение лиганда принимали конформации, для которых среднеквадратичное отклонение (RMSD) не превышало 1,5 Å по сравнению с 24(*S*)-24,25-эпоксихолестерином в структуре 1P8D.

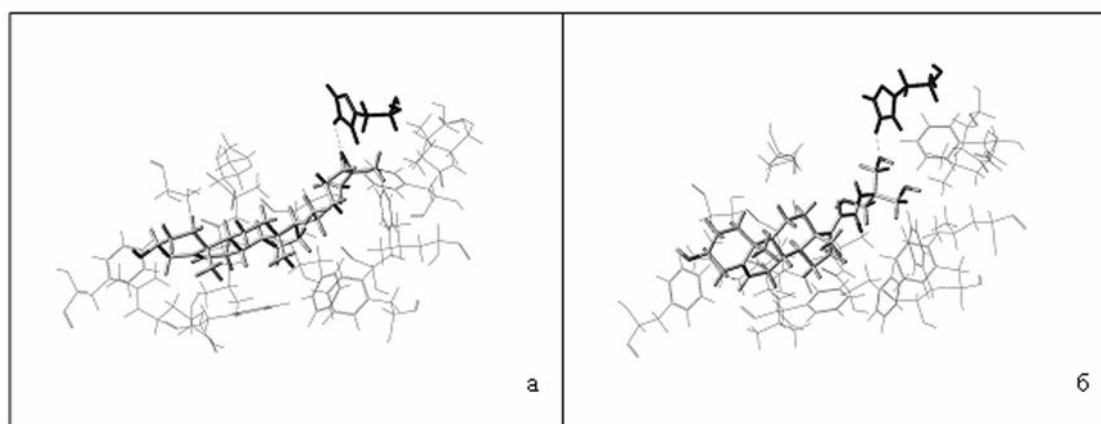


Рисунок 3.

Докинг 24(*S*)-24,25-эпоксихолестерина (а) и соединения **4(E)** (б) в место связывания лиганда LXR β . Водородная связь между остатком His-435 и полярной группой лиганда показана пунктирной линией.

Анализ результатов докинга 17(20)*Z*- и 17(20)*E*-изомерных амидов **1(Z)**, **1(E)**, **2(Z)**, **2(E)**, **3(Z)**, **3(E)**, **4(Z)**, **4(E)** показал, что ни один из 17(20)*Z*-изомеров не вписывается в место связывания лиганда LXR β . Все 17(20)*E*-изомеры были способны связываться с рецептором, при этом их стероидный фрагмент располагался аналогично стероидному фрагменту 24(*S*)-24,25-эпоксихолестерина и находился в том же гидрофобном окружении. Метильные и гидроксиметильные заместители в амидном фрагменте соединений **2(E)**, **3(E)** и **4(E)** по результатам докинга не препятствовали связыванию с рецептором.

По оценочной функции докинга (оценка свзывания белок-лиганд), лучшим лигандом был [17(20)*E*]-3 β -гидрокси-21-{[2-(бис-2,2-дигидроксиметил)-2-пропил]-1-амино}-21-оксопрегна-5,17(20)-диен **3(E)** (-53,5 ккал/моль). Однако существование данного комплекса представляется маловероятным из-за высокой внутренней энергии данного конформера. По-видимому, соединение **3(E)** может связываться с LXR в конформации с углом $\theta_{20,21}$ близким к 0°, поскольку эта конформация соответствует минимуму внутренней энергии, и оценка энергии межмолекулярного взаимодействия для него ненамного выше, чем для конформера с углом $\theta_{20,21} = 180^\circ$. Соединения **1(E)**, **2(E)**, и **4(E)** в конформациях с углом $\theta_{20,21} \sim 0^\circ$ имели величины оценочной функции близкие к таковой для соединения **3(E)**.

Ранее было показано [16, 17], что связывание молекулы стерина или его аналога, содержащего полярную группу в боковой цепи, с LXR β сопровождается образованием водородной связи между этой полярной группой и остатком His-435. Модели комплексов LXR β с соединениями **1(E)**, **2(E)**, **3(E)** и **4(E)** (рис. 3) свидетельствуют о возможности образования водородной связи между гидроксильной группой амидного фрагмента лиганда с остатком His-435. Таким образом, результаты молекулярного докинга предсказывают возможность активации LXR β соединениями **1(E)**, **2(E)**, **3(E)** и **4(E)**, но не для соответствующих 17(20)*Z*-изомеров. Однако близость величин оценочных функций, полученных для *E*-изомеров, не позволило выбрать соединение, которое с наибольшей вероятностью должно было эффективно связываться с LXR β .

Активация LXR α и LXR β в клетках, как известно, стимулирует липогенез, поскольку транскрипция гена синтазы жирных кислот (FAS, одного из ферментов, лимитирующего скорость биосинтеза триглицеридов) регулируется LXR [22]. Чтобы экспериментально проверить результаты молекулярного моделирования мы оценили влияние соединений **1(Z)**, **1(E)**, **2(Z)**, **2(E)**, **3(Z)**, **3(E)**, **4(Z)**, **4(E)** на скорость биосинтеза триглицеридов в клетках гепатомы Нер G2 (стандартной клеточной модели для изучения регуляции биосинтеза липидов в печени [23]). В качестве положительного контроля был использован 25-гидроксихолестерин (25-НС), активирующий липогенез и стимулирующий биосинтез триглицеридов в клетках Нер G2.

Результаты представлены на рисунке 4. В условиях нашего эксперимента только соединение **1(E)** достоверно стимулировало биосинтез триглицеридов ($p < 0,05$), его эффект был сравним с таковым для 25-НС ($p < 0,05$). Уровень биосинтеза триглицеридов в присутствии соединений **2(E)**, **3(E)** и **4(E)**, был выше, чем в контроле, хотя стимулирующий эффект не был достоверным. Сравнение эффектов соединений **1(E)**, **2(E)**, **3(E)** и **4(E)** свидетельствует, что наличие дополнительных метильных или гидроксиметильных групп в амидном фрагменте снижает регуляторный эффект. Ни один из 17(20)*Z*-изомеров не влиял на уровень биосинтеза триглицеридов. Таким образом, результаты эксперимента согласуются с данными молекулярного моделирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты данной работы позволяют предположить, что ядерный рецептор LXR является одной из мишеней для 17(20)*E*-прегна-5,17(20)-диен-21-оиламидов. 17(20)*E*-Прегна-5,17(20)-диен-21-оиламиды (но не 17(20)*Z*-изомеры) могут в определенной конформации связаться в полости лиганд-связывающего домена LXR β и активировать липогенез в клетках Нер G2.

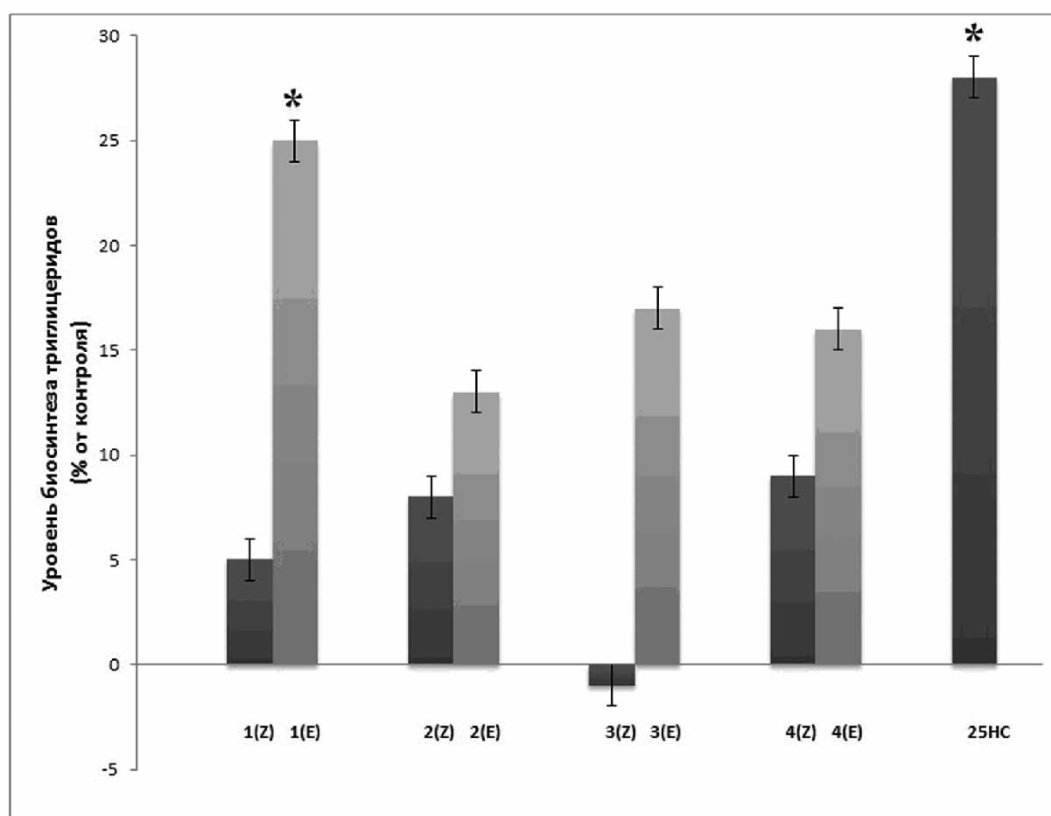


Рисунок 4.

Влияние соединений 1(Z), 1(E), 2(Z), 2(E), 3(Z), 3(E), 4(Z), 4(E) и 25-НС на уровень биосинтеза триглицеридов в клетках Нер G2. За 100% принят уровень биосинтеза триглицеридов в контроле, составляющий 85200 имп./мин/1 мг клеточного белка за 4 ч.

* – статистически значимые отличия средних значений от контроля ($p < 0,05$).

Работа выполнялась в рамках НИР по направлению Программы фундаментальных исследований РАМН “Поиск молекулярных мишеней, компьютерное конструирование и получение биологически активных веществ, исследование их фармакологического действия и безопасности. Создание систем транспорта лекарств” и проекта РФФИ № 12-04-31075-мол_a.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Schroepfer G.* (2000). *J. Physiol. Rev.*, **80**, 361–554.
2. *Björkhem I.* (2007) *Lipids*, **42**, 5–15.
3. *Björkhem I.* (2009) *J. Lipid Res.*, **50**, (Suppl), S213-S218.
4. *Olkkonen V.M.* (2009) in: *Cellular Lipid Metabolism* (C. Ehnholm, ed.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 27-71.
5. *Javitt N.B.* (2008) *Steroids*, **73**, 149–157.
6. *Gill S., Chow R., Brown A.J.* (2008) *Prog. Lipid Res.*, **47**, 391-404.
7. *Vaya J., Schipper H.M.* (2007) *J. Neurochem.*, **102**, 1727-1737.
8. *Smith L.L.* (1981) *Cholesterol autoxidation*. Plenum Press, N.Y.
9. *Smith L.L., Johnson B.* (1989) *Free Rad. Biol. Med.*, **7**, 285-331.

10. *Smith L.L.* (1996) *Lipids*, **31**, 453-487.
11. *Taylor F.R., Saucier S.E., Shown E.P., Parish E.J., Kandutsch A.A.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 12382-12387.
12. *Janowski B., Grogan M.J., Jones S.A., Wisely G.B., Kliewer S.A., Corey E.J., Mangelsdorf D.J.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 266-271.
13. *Spencer T.A., Li D., Russel J.S., Collins J.L., Bledsoe R.K., Consler T.G., Moore L.B., Galardi C.M., McKee D.D., Moore J.T., Watson M.A., Parks D.J., Lambert M.H., Willson T.M.* (2001) *J. Med. Chem.*, **44**, 886-897.
14. *Makishima M.J.* (2005) *Pharmacol. Sci.*, **97**, 177-183.
15. *Quinet E.M., Savio D.A., Halpern A.R., Chen L., Miller C.P., Nambi P.* (2004) *J. Lipid Res.*, **45**, 1929-1942.
16. *Williams S., Bledsoe R.K., Collins J.L., Boggs S., Lambert M.H., Miller A.B., Moore J., McKee D.D., Moore L., Nichols J., Parks D., Watson M., Wisely B., Willson T.M.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27138-27143.
17. *Svensson S., Ostberg T., Jacobsson M., Norstrom C., Stefansson K., Hallen D., Johansson I.C., Zachrisson K., Ogg D., Jendeberg L.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 4625-4633.
18. *Stulov S.V., Zavialova M.G., Mehtiev A.R., Novikov R.A., Tkachev Y.V., Timofeev V.P., Misharin A.Y.* (2010) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5495-5498.
19. *Stulov S.V., Tkachev Y.V., Novikov R.A., Zavialova M.G., Timofeev V.P., Misharin A.Y.* (2012) *Steroids*, **77**, 77-84.
20. *Stulov S.V., Mankevich O.V., Dugin N.O., Novikov R.A., Timofeev V.P., Misharin A.Y.* (2013) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2014-2018.
21. *Goldstein J.L., Basu S.K., Brown M.S.* (1983) *Methods Enzymol.*, **98**, 241-260.
22. *Javitt N.B.* (1990) *FASEB J.*, **4**, 161-167.
23. *Ducheix S., Lobaccaro J.M.A., Martin P.G., Guillou H.* (2011) *Chem. Phys. Lipids*, **164**, 500-514.

Поступила: 10. 12. 2012.

**MOLECULAR MODELING OF INTERACTION
OF 17(20)Z- AND 17(20)E-PREGNA-5,17(20)-DIEN-21-OYL AMIDES
WITH THE NUCLEAR RECEPTOR LXR β**

*I.V. Fedyushkina, S.V. Stulov, N.O. Dugin, A.Yu. Misharin, A.R. Mehtiev,
G.E. Morozovich, A.V. Veselovsky*

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: 499-245-0768; fax: 499-245-0857;
e-mail: veselov@ibmh.msk.su

Aiming the search of novel regulators of lipid metabolism and their potential targets, in this study we performed molecular modeling of eight isomeric 17(20)Z- and 17(20)E-pregna-5,17(20)-dien-21-oil amides differing in structure of the amide moiety. Analysis of the low energy conformers revealed that all 17(20)E-isomers had three main energy minima (corresponding to values of the dihedral angle $\theta_{20,21}$ (C17=C20-C21=O) $\sim 0^\circ$, $\sim 120^\circ$ and $\sim 240^\circ$), the most occupied minimum was found to correspond to $\theta_{20,21} \sim 0^\circ$; while 17(20)Z-isomers had either one or two pools of low energy conformations. Molecular docking of these compounds to the ligand-binding site of the nuclear receptor LXR β (a potential target) indicates high probability of binding for E-isomers and the absence of that for Z-isomers. Results of the molecular modeling were confirmed by an experiment in which stimulation of triglyceride biosynthesis in Hep G2 cells in the presence of 17(20)E-3 β -hydroxypregna-5,17(20)-dien-21-oil (hydroxyethyl)amide was demonstrated.

Key words: prena-5,17(20)-dien-21-oil amides, docking, LXR, nuclear receptor, triglyceride biosynthesis, Hep G2.