

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики
доц. Нипорко Олексій Юрійович
Протокол № ____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 20__ р.

**КОМП'ЮТЕРНЕ МОДЕЛЮВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ 2-(3,4-
ДИГІДРОКСИФЕНІЛ)-3,4-ДИГІДРО-2Н-ХРОМЕН-3,5,7-ТРІОЛУ З
ТЕЛОМЕРАЗОЮ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студентки спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»

Заяц Інни Олександрівни

Науковий керівник від кафедри
доцент кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
к.б.н. **Нипорко Олексій Юрійович**

Робота виконана у відділі біохімії
Торонтського університету
під керівництвом проф. Lea Harrington

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Заяц І.О. Дослідження стійкості людської теломерази до маломолекулярних інгібіторів. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)». У роботі проведено дослідження з моделювання взаємодії інгібітору 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолу з ферментом теломеразою; передбачені сайти зв'язування на поверхні теломеразної РНК та білкової каталітичної одиниці, а також проведено докінг. Встановлений потенційний сайт зв'язування 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолу на поверхні теломерази; аміно- та нуклеїнові залишки, що беруть участь у взаємодії з лігандом; типи взаємодій та довжини зв'язків. Отримані результати можуть бути використані для подальших *in vitro* досліджень.

Ключові слова: теломераза, інгібітори теломерази, 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріол, (+)-катехін, катехіни, поліфеноли, рак, докінг.

ANNOTATION

Zaiats I.O. – Bachelor's final qualifying work in the specialty 091 Biology OP "Biology (high technologies)". A study was conducted on modelling 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol interaction with the enzyme telomerase; predicted binding sites on the telomerase RNA and protein catalytic unit surfaces, and docking was performed. The potential binding site of 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol on the surface of telomerase was established, as well as amino and nucleic residues involved in the interaction with the ligand, and types of interactions and lengths of bonds. The obtained results can be used for further *in vitro* docking studies.

Keywords: telomerase, telomerase inhibitors, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol, (+)-catechin, catechins, polyphenols, cancer, docking.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ I. Літературний огляд.....	9
1.1. Що таке теломераза і як вона працює.....	9
1.1.1. Структура теломерази.....	11
1.1.2. Функції теломерази.....	16
1.2. Теломери та теломераза – зв’язок із старінням та клітинним безсмертям...17	17
1.2.1. Сенесценс як ознака старіння.....	17
1.2.2. Як сенесценс протидіє розвитку ракових ознак?.....	19
1.3. Способи пригнічення теломеразної активності.....	22
1.3.1. Антираковий ефект 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2H-хромен-3,5,7-тріолу.....	24
РОЗДІЛ II. Матеріали та методи дослідження.....	26
2.1. Молекулярний докінг як метод.....	26
2.2. Пошук структур теломерази та (+)-катехіну для дослідження.....	26
2.3. Передбачення зв’язувальних кишень.....	27
2.4. Програмне забезпечення для підготовки молекул до докінгу.....	27
2.5. Візуалізація результатів.....	28
РОЗДІЛ III. Результати та обговорення.....	29
3.1. Визначення сайтів зв’язування на поверхні hTERT та hTR.....	29
3.2. Підготовка рецептору та ліганду до докінгу.....	30
3.3. Докінг hTERT.....	31
3.4. Докінг hTR.....	34

3.5. Перевірка сайтів зв'язування на перекривання і повторний докінг.....	37
ВИСНОВКИ.....	42
ПОДЯКА.....	43
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	44
ДОДАТОК 1.....	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

TERT	telomerase reverse transcriptase
TERC	telomerase RNA component
hTR	human telomerase RNA
TR	telomerase RNA
TCAB1	telomerase Cajal body protein 1
NHP2	non-histone chromosome protein 2
NOP10	nucleolar protein 10
GAR1	glycine arginine rich 1
Hsp90	heat shock protein 90
SRSF11	serine and arginine rich splicing factor 11
DKC1	dyskerin pseudouridine synthase 1
scaRNA	small cajal body-specific RNA
TRBD	telomerase RNA-binding domain
NTE	N-terminal extension
CTE	C-terminal extension
pRB	retinoblastoma protein
PD-L1	programmed death-ligand 1
PD-1	programmed cell death protein 1
TGF- β	transforming growth factor beta
IL	interleukin

IFD insertion in fingers domain

RCSB Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

SASP Senescence-Associated Secretory Phenotype

ЛПНЦ ліпопротеїни низької щільності

ВСТУП

Важливість дослідження раку є беззаперечною в сьогоденнішніх реаліях. Серед чотирнадцяти описаних ракових ознак функціонування такої характеристики пухлин, як реплікативне безсмертя забезпечується активністю фермента теломерази [30,34]. Теломераза є чудовим раковим біомаркером, оскільки активна лише в ракових, статевих та в клітинах з високою проліферацією, такі як стовбурові [10,15,18].

Антиракові властивості такого класу сполук, як катехіни, що широко поширені в природі, добре описані в літературі [43,44]. Сполуки виявляють інгібувальні властивості щодо теломерази. Уперше інгібувальна дія теломерази таким катехіном як 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолом була описана у статті Е. О. Kodichinma та іншими у 2020 році, проте, як зазначили автори, природа взаємодії сполуки з ензимом не є дослідженою. У цьому і полягає **актуальність роботи**.

Об'єктом дослідження є фермент теломераза. **Предметом дослідження** є взаємодія теломерази з 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолом.

Метою дослідження є змоделювати природу взаємодій між теломеразою та 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолом. Відповідно до мети було поставлено наступні **задачі**:

1. Ознайомитися з літературою на обрану тему.
2. Змоделювати взаємодію 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріол-теломераза користуючись біоінформатичними методами.
3. Визначити залишки, що беруть участь у взаємодії.
4. Визначити типи зв'язків, що беруть участь у зв'язуванні, їхні довжини.

РОЗДІЛ І

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Що таке теломераза і як вона працює

Теломераза (рис.1.1) – це спеціалізована ДНК полімераза, яка досинтезовує одноланцюгові повтори TTAGGG на 3'-кінцях теломер *de novo* [1].

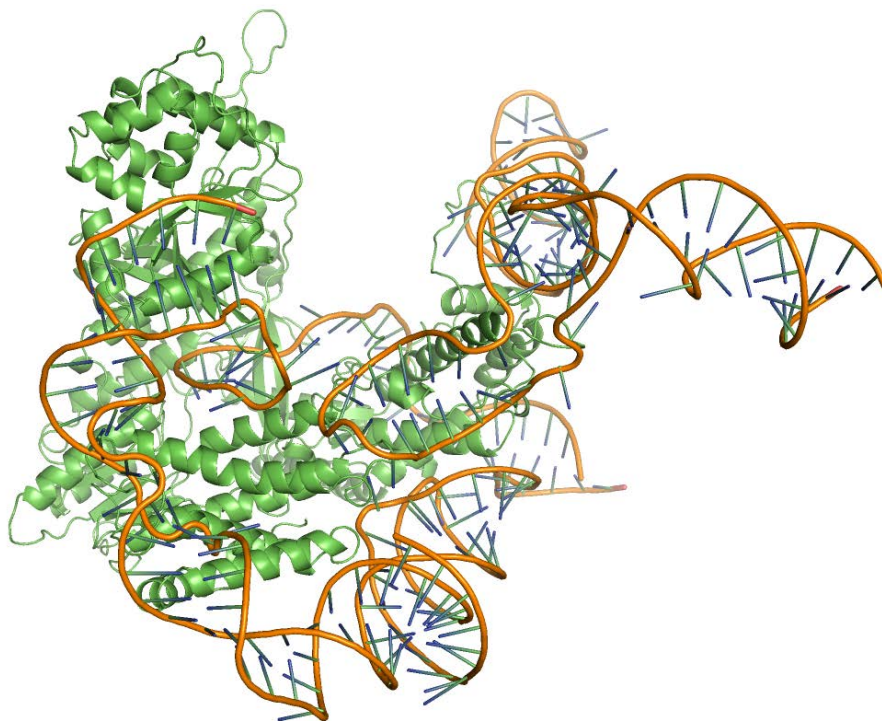


Рис.1.1 – 3D структура людської теломери [50]

Фактично вона є зворотною транскриптазою. Теломераза складається з двох субодиниць: РНК (hTR/TER/TR), яка служить матрицею для синтезу теломерної ДНК і кодується геном TERC, і білкової каталітичної компоненти (TERT), що кодується геном TERT [1,2]. Доведено, що мінімальним каталітичним ядром теломери є комплекс TERT та TR [3]. На основі даних, отриманих з експериментів по дослідженню активності теломери з двома різними мітками TERT, а також молекулярної ваги, зроблено висновок, що теломераза – це

димер з двома молекулами TERT і TR [14]. Фермент експресується в соматичних клітинах, проте каталітична одиниця TERT зазнає сайленсингу [10,18,24].

Субодиниці теломерази обслуговуються рядом протеїнів: дискерином (DKC1), протеїном 1 тілець Кахаля (TCAB1), негістоновим хромосомним протеїном 2 (NHP2), нуклеолярним протеїном 10 (NOP10), GAR 1 (glycine arginine rich 1), білком теплового шоку 90 (Hsp90), фактором сплайсингу 11 (SRSF11). Такий комплекс є необхідним для підтримання теломерного гомеостазу [15].

В людському організмі теломераза активна в статевих клітинах та в клітинах з високою проліферацією: гематопоетичних стовбурових клітинах, активованих лімфоцитах, плюрипотентних клітинах епідермісу, проліферативному ендометрії та клітинах кишкових залоз. Теломерне вкорочення спостерігається навіть у стовбурових клітинах людського організму. Це означає, що теломеразна активність є достатньою для сповільнення вкорочення теломер, але вона не запобігає йому [10].

Для того, щоб перейти до характеристики роботи теломерази, слід почати з теломер. Теломери – це спеціалізовані структури на кінцях хромосом, що слугують для захисту від генної ерозії, нуклеазних атак і негомологічного з'єднання кінців [37]. Крім того, вони також не дозволяють хромосомам зливатися одна з одною і відповідальні за прикріплення до ядерного матриксу, підтримуючи таким чином цілісність геному та його впорядкованість всередині ядра. У більшості еукаріотичних клітин теломери складаються з тандемних повторів TTAGGG у напрямку 5'-3'. Довжина теломер у ссавців варіюється між різними типами тканин, і навіть в окремих клітин вона може відрізнятися [1]. Багаті на гуанін регіони можуть згортатися у G-квадруплексну ДНК [37].

Послідовність теломер починається дволанцюговою і закінчується одноланцюговою ДНК через проблему кінцевої недореplikації. Її суть полягає в

тому, що видалення крайнього РНК-праймеру, комплементарного 3'-кінцю ланцюга лінійної материнської ДНК призводить до вкорочення дочірнього ланцюга і утворення одноланцюгового «хвоста» [38]. Ця ділянка не може бути досинтезована за відсутності 3'-кінця, який розпізнається як праймер. Окрім того, одноланцюгові хвости піддаються нуклеазним атакам, тому після кожного раунда реплікації кінці хромосоми вкорочуються [39].

Одним з вирішень проблеми кінцевої недореplікації є активація теломерази, яка запобігає вкороченню теломер і подальшому реплікативному арешту. Саме робота теломерази забезпечує формування такої ракової ознаки як реплікативне безсмертя, завдяки якій ракові клітини мають практично необмежену тривалість клітинного циклу. Теломераза впізнає одноланцюгові 3'-кінці материнського ланцюга і використовує їх як праймери для нарощення. Теломеразна РНК служить матрицею для синтезу, зв'язуючись з 3'-кінцем. Синтез дочірніх ланцюгів ДНК у подальшому відбувається з використанням досинтезованих теломеразою одноланцюгових кінців як матриці. Елонгація теломерних кінців теломеразою включає в себе такі етапи:

1. Впізнання праймеру: 3'-кінець з'єднується з матричною ділянкою hTR.
2. Нарощення ланцюга каталітичною одиницею з використанням РНК як матриці.
3. Транслокація та повтор раунду [40].

1.1.1. Структура теломерази

Як вже було зазначено, ензим складається з двох субодиниць: РНК матриці та білкової каталітичної компоненти.

TR (telomerase RNA) – РНК компонента теломерази, що містить у собі матрицю для синтезу теломерної ДНК. Матричний регіон TR охоплює 11 нуклеотидів (5'-CUAACCCUAAC) і є комплементарним до теломерної послідовності (TTAGG)_n [5]. Її класифікують як малу РНК тілець Кахаля (Cajal body-specific RNAs – scaРНК) [8,9] .

Теломеразна РНК еволюційно відрізняється між видами незважаючи на консервативну вторинну структуру та механізм подовження теломер: довжина людської TR становить близько 450 нуклеотидів, у той час як у в'їчастих це число коливається від 147 до 209 нуклеотидів, від 779-1817 у дріжджів та від 312 до 559 у хребетних [4,5,24].

Між теломеразними РНК багатьох в'їчастих, дріжджів та людською TR не було знайдено жодних схожих рис у розмірі чи послідовності. Наведені вище факти вказують на те, що послідовність РНК не є консервативною, проте певні мотиви все ж присутні у кожній: серед них матриця, псевдовузол та шпилька (рис.1.2) [4,5].

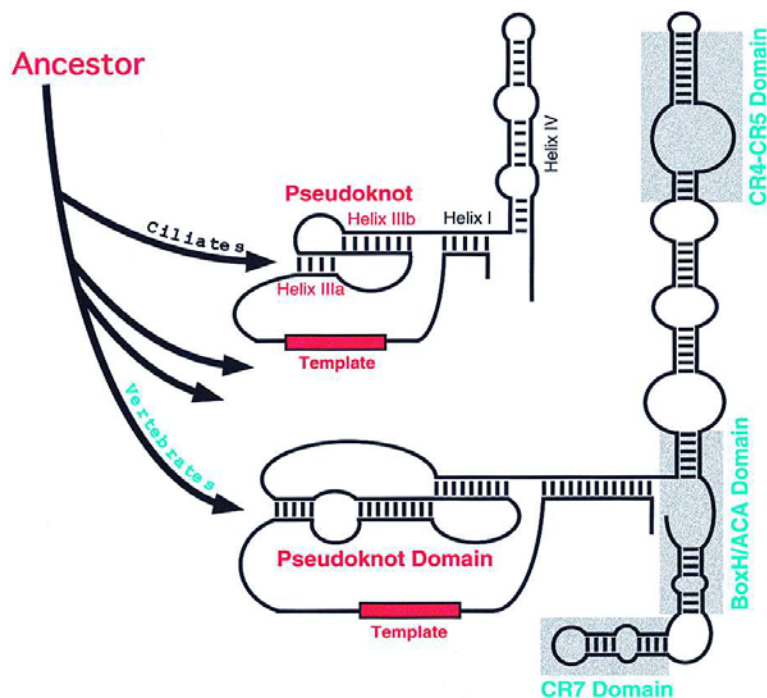


Рис.1.2 – Порівняння структур теломеразної РНК в'їчастих та хребетних
(Відтворено з [7])

Чен та інші (2000) провели дослідження з визначення вторинних структур TR, проаналізувавши 32 гени РНК різних видів. У результаті дослідження ними було виявлено 8 консервативних регіонів (CR – conserved region).

Матричний регіон (CR1) теломеразної РНК зберігає інформацію про послідовність додавання теломерних повторів. Мінімальною консервативною послідовністю, характерною для хребетних є послідовність CUAACCCU, що вказує на її важливість для відтворення матричної функції. Проте, матриця не є лише пасивним носієм інформації. Заміни однієї або декількох пар основ призводять таких мутацій продукту як місметчі (утворення некомплементарних пар нуклеотидів), проковзування матриці (slippage), передчасна дисоціація [7].

Псевдовузол (CR2/CR3) та матриця становлять спільний домен TR. Еволюційна консервативність ділянки псевдовузла вказує на те, що він є важливим у підтримці функціонування ферменту. Дослідниками відзначається

його критичність для роботи ензиму: мутантна теломераза з заміною нуклеотидів у домені псевдовузла в позиції 176 не відновила свою активність [7]. Мутація GC → AG (107-108) призводить до дестабілізації структури псевдовузла з подальшою інактивацією теломерази. Така мутація зустрічається у хворих на дискератоз – рідкісне захворювання, що супроводжується аномальною пігментацією шкіри, дистрофією нігтів, лейкоплакією слизових оболонок та недостатністю кісткового мозку. Мутації, знайдені у хворих на дискератоз, вказують на регіони, необхідні для функціонування теломерази [8].

Шпилька (stem terminus element (STE)) розташована в термінальній частині РНК та відіграє важливу роль в активності ферменту, стимулюючи його каталітичну активність. Прикладами шпильок можуть бути Р6.1 у хребетних та петля IV у війчастих. Заміна декількох залишків STE зменшує каталітичну активність теломерази, проте не впливає на зв'язування ензиму. Однією з функцій STE є алостерична модуляція взаємодій доменів TERT. Коли STE взаємодіє з РНК-зв'язуючим доменом TERT TRBD, вона впорядковує розташування домену RT (reverse transcriptase domain) для правильного докінгу матриці [5].

На відміну від війчастих та інших, окрім матриці та псевдовузла, хребетні мають такі консервативні домени: CR4-CR5, що включає шпильку, H/ACA бокс (CR6, CR8) та CR7 домен [7].

Найімовірніше, домен H/ACA бокс забезпечує правильний процесинг 3'-кінця і стабільність РНК. Мутації в обох H (CR6) та ACA (CR8) мотивах призводять до зменшення рівня теломеразної РНК в клітинах, а також дестабілізують активність TR *in vitro* [7,24].

Висококонсервативний CR4-CR5 домен є критичним для роботи ензиму. Мутації в ньому зменшують або інактивують активність теломерази як *in vitro*,

так і *in vivo* [8]. Домен включає в себе петлі P5, P6 та P6.1 шпильку, яка є необхідною для взаємодії CR4-CR5 домену з доменом «великого пальця» та TRBD TERT, і, відповідно, забезпечення каталітичної активності ферменту [6,8].

CR7 домен відіграє роль в акумуляції РНК в тільцях Кахаля [9]. Малі РНК тілець Кахаля містять послідовність мотиву Cajal body box (CAB) на 5' чи 3'-кінці [8,9].

TERT (зворотня транскриптаза теломерази) – білкова каталітична одиниця ензиму. На відміну від TR, яка широко експресується в багатьох типах тканин, локус TERT зазнає сайленсингу [10,18,24]. TERT має спільні структурні риси з ретровірусними зворотними транскриптазами, вірусними РНК-полімеразами та ДНК-полімеразами В-родини бактеріофагів [13]. Субодиниця складається з трьох елементів: N-термінальне розширення (NTE), центральний каталітичний RT елемент і коротке С-термінальне розширення (STE). NTE включає в себе консервативні N-термінальний (TEN) та TRBD домени [11,12]. Архітектура протеїну представлена кільцеподібною структурою з відмітними мотивами «великий палець», «долоня» та «пальці», що створюють велику внутрішню порожнину для зв'язування РНК-матриці з ДНК під час теломерної елонгації [6,12].

TEN-домен містить залишки, що є критичними для підтримки активності ферменту, а також відповідає за зв'язування з одноланцюговою теломерною ДНК. Тобто, відіграє важливу роль у розпізнаванні субстрату та елонгації [12].

Доменом, що зв'язує РНК-матрицю теломерази з її каталітичною одиницею є TRBD домен TERT. TRBD зв'язується з доменом матриці/псевдовузла і STE [12].

Людський RT-домен організований у два субдомени «пальці» та «долоня», та включає вісім еволюційно консервативних мотивів: 1, 2, 3, A, IFD, B', CD, E [12]. Субдомен «пальців» зв'язується з ДНК, а «долоня» є каталітичним сайтом [63]. IFD необхідний для функціонування процесивності додавання нуклеотидних повторів (RAP) теломеразою [62].

На відміну від двох попередніх доменів, STE, який представляє собою домен «великого пальця», не є висококонсервативним, що свідчить про специфічність його функцій залежно від виду. С-кінець TERT складається зі спірального пучка, який має у складі декілька петель, що беруть участь у формуванні та стабілізації РНК-ДНК гетеродуплексу в активному сайті ензиму, впливаючи на його процесивність. Людський STE-домен містить три консервативні мотиви E-I, E-II та E-III. Мутації в цих мотивах є причинами таких захворювань як апластична анемія, дискератоз та ідіопатичний легеневий фіброз [12, 71,72].

1.1.2. Функції теломери

Функції теломери поділяють на канонічні та неканонічні. Найголовнішою канонічною функцією теломери є підтримка теломерної довжини додаванням TTAGGG (у випадку хребетних; TTGGGG – у війчастих) повторів до 5'-кінця. Відомо, що в організмі теломераза активна в статевих, стовбурових та клітинах з високою проліферацією. Проте, у ракових клітинах подовження теломер відбувається шляхом реактивації ферменту.

Неканонічні функції теломери можна поділити на дві групи: 1) залучення теломеразної активності без елонгації теломер; 2) залучення неактивного ферменту. Важливо додати, що неканонічні функції пов'язані з впливом на

ракові властивості клітини та прогресію хвороби. Це включає незалежну від теломер регуляцію головних метаболічних механізмів, епігенетичну регуляцію хроматину, генну експресію, реакцію на стрес, шляхи сигнальної трансдукції, РНК-сайленсинг, посилення мітохондріальної функції. Окрім звичного розташування в межах ядра, TERT може бути знайдена в цитоплазмі та мітохондріях. Серед функцій *цитоплазматичної* TERT взаємодія з сигнальними шляхами, такими як Wnt/ β -катенін, а також формування TERT-NF- κ B субодиниці комплексу p65. *Мітохондріальна* TERT становить 10-20% усієї клітинної TERT. Серед її функцій захист мітохондріону від навколишнього середовища та оксидативного стресу шляхом зв'язування протеїну з регіонами мітохондріальної ДНК, які регулюють виділення реактивних форм кисню, а також підвищення активності дихального ланцюга. Рівень експресії TERT корелює з VEGF, оскільки протеїн здатен регулювати та індукувати його експресію, зв'язуючись з генним промотором. Також TERT регулює експресію гену c-myc, який активований у багатьох онкогенних шляхах. Інгібування hTR, у свою чергу, знижує експресію 138 генів. Регуляцію структури хроматину теломеразою пов'язують з тривалим зниженням рівню hTERT в клітині [15,58-61].

1.2. Теломери та теломераза – зв'язок із старінням та клітинним безсмертям

1.2.1. Сенесценс як ознака старіння

Старіння – це процес, який характеризується поступовою втратою фізіологічної цілісності, що призводить до втрачання функцій та підвищеної вразливості до смерті. Ознаками старіння є геномна нестабільність, теломерне виснаження, епігенетичні перетворення, втрата протеостазу, дерегульоване

розпізнавання поживних речовин, мітохондріальна дисфункція, клітинний сенесценс, виснаження стовбурових клітин та зміни міжклітинних комунікацій.

Як не дивно, рак і старіння мають багато зворотних процесів. Рак є наслідком аномального підвищення клітинної пристосованості, старіння – її втрати. Щоб зрозуміти, як саме сенесценс пов'язаний з раком, слід розглянути це явище.

Сенесценс – це стабільний арешт клітинного циклу, поєднаний із стереотипними фенотиповими змінами. Сенесценс не є синонімом старіння, оскільки сенесцентні клітини присутні на різних етапах життя, хоча й з віком їхній відсоток збільшується. Доказом останнього є результати дослідження, проведеного на мишах: у молодих особин кількість сенесцентних клітин становила ~8%, у дуже старих мишей – ~17% [26]. Вважається, що роль сенесценсу полягає у запобіганні поділу пошкоджених, потенційно онкогенних клітин, та залученні імунної системи до їхньої подальшої загибелі.

Що призводить до сенесценсу? Перш за все, причиною сенесценсу є обмежений реплікативний потенціал, що у свою чергу є наслідком вкорочення теломер. Теломери мають тенденцію вкорочуватися в S фазі кожного клітинного циклу [27]. Коли число клітинних поділів досягає ліміту Хейфліка, тобто 70-80, а теломери стають настільки короткими, що провести наступний поділ стає неможливим – клітина переходить у стан сенесценсу. Лише ті клітини, що мають властивості ракових, можуть ділитися невизначену кількість разів [27].

Окрім коротких теломер та теломерної ерозії є безліч інших стимулів сенесценсу, які можуть дещо відрізнитися *in vivo* та *in vitro*. Серед *in vivo* стимулів ушкодження нетеломерних ділянок ДНК, релаксація хроматину без фізичного ушкодження інгібіторами деяких речовин, сильні мітогенні та онкогенні сигнали, реактивні форми кисню. *In vitro* стимулами сенесценсу є

невідповідний субстрат, використання невідповідного клітинного середовища і оксидативний стрес, викликаний гіперфізіологічними концентраціями атмосферного O₂ [27].

Основними функціями сенесценсу є пригнічення, і, як не парадоксально, сприяння розвитку пухлин, загоювання тканин та участь у старінні [27].

Пригнічення розвитку пухлин сенесцентними клітинами полягає в запуску мереж супресорів пухлин, найважливішими серед яких є шляхи p53 та pRB/p16 [27, 28]. Окрім того, що вони відіграють роль в пригніченні пухлин, правильне функціонування цих шляхів визначає здатність клітини до сенесценсу. Майже всі онкогенні захворювання накопичують мутації в цих шляхах, саме тому їхня безпомилкова робота є критичною для антиракової клітинної протидії [27].

Сприяння пухлинного розвитку пов'язане зі сенесценс-асоційованим секреторним фенотипом (SASP), який характеризується виділенням прозапальних цитокінів. Залежно від стану клітини, цитокіни матимуть на неї різну дію. Вплив окремих є важливим фактором для ініціації та підтримання сенесценсу, як наприклад, IL-6 та IL-8, які є одними з сенесцентних *in vivo* маркерів. У той же час, IL-6 та IL-8 здатні сприяти розвитку сусідніх преонкогенних чи слабкоонкогенних клітин [27, 28].

Укорочення теломер з наступним переходом до сенесценсу є важливим протипухлинним механізмом, який ракові клітини, однак, здатні обходити рядом способів. Один з таких методів – це активація теломерази, тому питання пошуку її ефективних інгібіторів є актуальним.

1.2.2. Як сенесценс протидіє розвитку ракових ознак?

Як відомо, сенесценс – це захисний протираковий механізм, що ініціюється на ранніх стадіях розвитку ракових процесів в клітині. На противагу низці ознак раку (серед них: реплікативне безсмертя, уникання супресорів росту, стійкий проліферативний сигналінг, запалення, що сприяє утворенню пухлин та уникнення руйнування імунною системою (рис.1.3)) існують механізми сенесценсу, які перешкоджають їхньому прогресуванню [29].

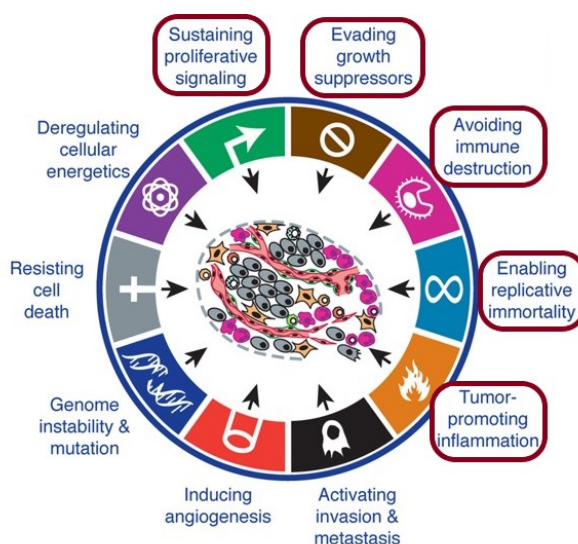


Рис.1.3 – Ракові ознаки, що можуть регулюватися механізмами сенесценсу (Адаптовано з [34])

Реплікативне безсмертя ракових клітин полягає у тому, що вони активують теломеразу та, як наслідок, можуть ділитися практично необмежену кількість разів. Нормальні соматичні клітини мають обмежений реплікативний потенціал через укорочення теломер після кожного мітотичного поділу і переходять у сенесценс при досягненні ліміту Хейфліка. При сенесценсі арешт клітинного циклу є *необоротним*, що запобігає переродженню клітин у злоякісні [30].

У забезпеченні тканинного гомеостазу важливу роль має квісценс. Квісценс – це стан *оборотного* клітинного арешту, у якому клітини здатні повернутися до клітинного циклу при наявності стимулу [31]. Такий стан забезпечується дією антипроліферативних сигналів, усі з яких виділяються білком ретинобластоми (pRb), а також p107 та p130. P16/pRB шлях є критичним для функціонування сенесценсу, оскільки білок p16 є інгібітором циклінзалежної кінази 4/6-залежного фосфорилування pRB. Перебуваючи у гіпофосфорильованому стані, pRB здатний блокувати клітинну проліферацію, таким чином відповідаючи за ініціацію сенесценсу. Втрата p16/pRB призводитиме до обходу сенесценсу раковими клітинами і порушенням ними тканинного гомеостазу. Ракові клітини використовують різноманітні шляхи для перешкоджання роботі p16/pRB, приміром, інгібуванням експресії інтегринів та молекул клітинної адгезії, які доставляють антипроліферативні сигнали до клітин. У цьому полягає суть такої ракової ознаки як *уникання супресорів росту* [29,30].

Нормальні клітини не проліферують за відсутності стимуляції мітогенними сигналами росту, які здатні індукувати перехід від квісцентного до проліферативного стану. *Стійкий проліферативний сигналінг* ракових клітин полягає в тому, що вони здатні продукувати такі фактори самостійно, що зменшує їхню залежність від зовнішніх сигналів. SOS-Ras-Raf-MAP – важливий сигнальний шлях, що регулює не тільки процеси проліферації, а й клітинного циклу, апоптозу та диференціації. Частота мутації такого протеїну як Ras варіюється в різних видах раку, проте він експресується в 30% в людських видах захворювання [32]. Одна з функцій Ras протеїнів – вивільнення мітогенних сигналів в клітину. SOS-Ras-Raf-MAP шлях є дерегульованим в ракових клітинах, однією з причин цього є перенесення пухлинами Ras онкогенів [30]. Постійна активація цього шляху призводить до негативної

відповіді, яка інгібує його [29]. Подібна негативна відповідь спостерігається і в онкоген-індукованому сенесценсі [33].

Пухлини щільно «просочені» запальними клітинами. Хронічні *запальні процеси можуть сприяти розвитку* раку виділенням компонентів необхідних для виживання пухлинного мікросередовища. Також для запальних клітин характерне продукування реактивних форм кисню, що може підвищувати мутагенність сусідніх ракових клітин [29, 34]. Проте, такі цитокіни як ІЛ-6, ІЛ-8 та ІЛ-1 матимуть різний вплив на клітину залежно від її стану: за умови активації певних онкогенів ці фактори стимулюватимуть розвиток пухлин. Однак, за іншої умови, вони пригнічуватимуть переродження клітини в ракову, викликаючи натомість необоротний арешт клітинного циклу [27].

Остання серед ракових ознак, до якої сенесценс має пригнічувальну відповідь – *уникнення руйнування імунною системою*. Ракові клітини мають безліч механізмів обходу детекції імунними клітинами [29]. Серед таких, наприклад, зміна поверхні клітини та виділення цитокінів, які впливають на багато процесів пухлиногенезу: проліферацію, агресивність пухлини, ангиогенез. Гліоми, експресуючи рецептор PD-L1, запобігають знищенню Т-клітинами, які мають на своїй поверхні білок до цього рецептору – PD-1. До того ж, вони також експресують імуносупресивні цитокіни TGF- β та ІЛ-10 [35]. У свою чергу, сенесцентні клітини виділенням цитокінів рекрутують та активують імунні клітини, такі як CD4⁺ Т-лімфоцити та макрофаги. Рекрутмент цих клітин супроводжується подальшим знищенням сенесцентних клітин [29,36].

1.3. Способи пригнічення теломеразної активності

Найбільша перевага інгібування TERT полягає в тому, що вона має підвищену експресію в ракових клітинах, і отже, є чудовим раковим біомаркером. Оскільки TERT є важливим лімітуючим фактором теломеразної активності, припускається, що каталітична одиниця є більш ефективною цілью для драг-дизайну, ніж hTR [15,18].

Інгібування теломерази відбувається прямими, непрямими інгібіторами та вакцинами. Прямі інгібітори – це молекули, які діють на компоненти теломерази: маломолекулярні, що впливають на hTERT та олігонуклеотидні, що впливають на hTR. Непрямими інгібіторами є стабілізатори G-квадруплексу чи інгібітори танкірази 1 [25].

Сполуками, що пригнічують безпосередньо теломеразу є: GRN163L (Іметельстат), BIBR1532, N-заміщений дигідропіразол та його похідні. Передклінічні дослідження показали, що GRN163L, зв'язуючись з hTR, ефективно інгібує теломеразу, зменшуючи карциногенність та інвазивність клітин. BIBR1532 призводить до інгібування формування довгих продуктів, що веде до прогресивного вкорочення теломер, арешту клітинного циклу та сенесценсу після кількох тижнів застосування. Проте, сполука не пройшла клінічні випробовування, оскільки при дозах, вищих ніж ті, які клітини здатні толерувати, BIBR1532 неспроможний інактивувати теломеразу в пухлинах. N-заміщений дигідропіразол має потенційний антираковий ефект проти чотирьох типів раку завдяки зв'язуванню з hTERT: шлунку, грудей, простати та печінки. Наведені вище речовини є синтетичними [6,15,21,23].

Органічними сполуками, що виявляють інгібувальну дію щодо теломерази є аліцин (часник), куркумін (куркума), силібінін (чортополох), катехіни (чайне листя) [15].

Силібінін знижує рівень мРНК, відповідальної за синтез білкової субодиниці, а також у комбінації з куркуміноїдами зменшує експресію гену hTERT. Похідні куркуміноїдів у свою чергу впливають на афінність між теломерами та теломеразою [21]. Аліцин пригнічує активність ферменту та викликає апоптоз клітин [22].

Антираковий ефект поліфенолів зеленого чаю, більш широко знаних як катехіни, давно відомий з багатьох досліджень. Найбільшу кількість катехінів (36%) свіжого листя чаю становлять (-)-епікатехін, (-)-епігаллокатехін, (-)-епікатехін-3-галлат, (-)-епігаллокатехін-3-галлат [41,43,44]. Антипухлинна дія катехінів включає широкий спектр різноманітних механізмів, серед яких сильні антиоксидантні властивості, втручання в роботу асоційованих з раком протеїнів та ферментів, індукування апоптозу, інгібування проліферації, а також зменшення розвитку пухлини, метастазів, ангіогенезу, розривів ДНК, ліпідної пероксидації. Вплив катехінів також полягає в інгібуванні теломерази [42-44].

Непрямий спосіб інгібувати теломеразу – це сайленсинг ферменту танкірази 1, яка полі-АДФ-рибозилує необхідний для активності ензиму TRF1 під час S-фази та витісняє його з теломер.

Інший спосіб полягає в стабілізації теломерних G-структур шляхом зв'язування їх з лігандами. Комплекс G-структура-ліганд запобігає доступу теломерази до теломер, і, таким чином, їхній подальшій елонгації. Відомими G-квадруплекс-стабілізуючими лігандами є теломестатин, BRACO-19, RHPS4, TmPyP4, 3,4-TmPyPz та інші [18,19,20].

Іншими перспективними засобами, що можуть інгібувати теломеразу, є пептидні вакцини. Єдиною серед них, що почала клінічні випробовування є вакцина GV1001 (KAEL-GemVax Co. Ltd., Республіка Корея). Використовується для лікування пацієнтів з меланомою, легеневою і гепатоцелюлярною

карциномами та раком підшлункової залози. Інша, мультипептидна GX301 вакцина завершила II фазу клінічних випробовувань у липні 2020 [15,16].

Ще один з можливих способів пригнічити теломеразну активність в ракових клітинах є терапія «геном самогубства» [16]. Аденовірусна система використовує бактеріальну нітроредуктазу, що знаходиться під контролем промотора TERT або TERC для експресії цитотоксичних продуктів, що вбивають ракові клітини [17]. Жодна з подібних терапій ще не вступила в клінічну фазу [16].

1.3.1. Антираковий ефект 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолу

2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріол (рис.1.4) широко поширений у чайному листі, а також вині [47]. Ця речовина ще відома під назвами (+)-ціаніданолу, (+)-катехіну, D-катехіну, катехолу. Це гетероциклічна, розчинна у воді, етанолі, ацетоні та деяких інших розчинниках сполука з молекулярною масою 290,273 [45,46]. (+)-катехін є більш біодоступним, ніж його (-)-енантіомер [48].

Окрім антиоксидантних властивостей, (+)-катехін має захисні властивості щодо серцево-судинної системи. Вживання катехінів пов'язують з підтримкою низького рівня холестеролу в плазмі через інгібування агрегації тромбоцитів та індукції вазодилатації, зниження окисної сприйнятливості ЛПНЩ. Захисний антираковий ефект катехінів спостерігається на всіх стадіях раку. На стадіях ініціації та стимулювання пухлини спостерігалось зниження формування пухлин у мишей при додаванні катехінів до дієти в концентраціях 0.1% і 1%. Також спостерігаються імуномодуляторна, протизапальна та захисна

нейрональна функції, пов'язані з антиоксидантними властивостями сполуки [49].

Уперше інгібувальна дія (+)-катехіну на теломеразу була описана у статті Е. О. Kodichinma та іншими (2020). Отримане авторами IC_{50} становило 4,7 нг/мкл. Однак, як зазначили автори, природа взаємодії (+)-катехіну з теломеразою є невідомою [41]. У цій роботі ми зосередимося на можливих сайтах зв'язування цієї сполуки з теломеразою та на тому, як ці передбачувані сайти взаємодії можуть впливати на функцію теломеразу.

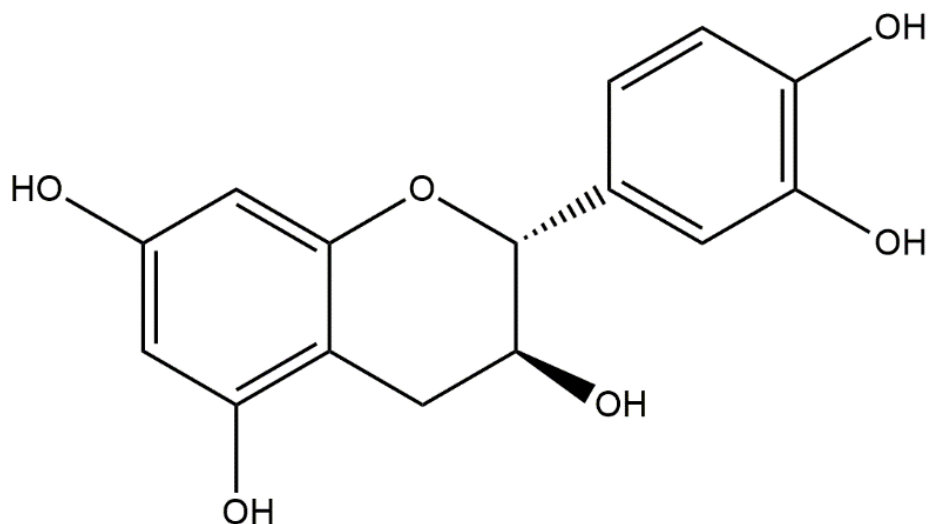


Рис.1.4 – Структура 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-хромен-3,5,7-тріолу

РОЗДІЛ II

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Молекулярний докінг як метод

Молекулярний докінг – це спроба передбачити найбільш вигідне положення між даними координатами двох молекул: рецептора і ліганду [54]. Він може бути двох видів: гнучким або жорстким. Гнучкий молекулярний докінг передбачає обертання зв'язків ліганду, зміну конформації, у той час як жорсткий не враховує гнучкості [56]. При виконанні роботи був застосований напівгнучкий докінг з гнучким лігандом і жорсткою структурою ензиму.

Точність і надійність результатів докінгу визначається оціночною функцією. Оціночна функція включає в себе такі основні задачі: 1) передбачити сайт зв'язування протеїну і спосіб зв'язування; 2) передбачити афінність ліганду до рецептору; 3) віртуальний скринінг потенційних лікарських засобів для обраної мішені [55].

2.2. Пошук структур теломерази та (+)-катехіну для дослідження

Пошук структури ферменту відбувався в базі тривимірних структур макромолекул Protein Data Bank (PDB). Була використана структура теломерази авторства Wan та інших (2021) з кодовою назвою [7V99](#), яка була отримана методом електронної мікроскопії за роздільної здатності мікроскопа 3.54 Å. Окрім hTERT та hTR, структура містила гістони H2A та H2B, а також ДНК праймер, проте вони не були взяті до аналізу [50].

Структура 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,4-дигідро-2H-хромен-3,5,7-тріолу була знайдена в базі макромолекул та асоційованих з ними малих молекул (кофакторів, інгібіторів...) RCSB PDB під кодовою назвою [KXN](#) [51,52].

2.3. Передбачення зв'язувальних кишень

Передбачення сайтів зв'язування hTERT. Для досягнення цієї цілі ми користувалися веб-сервісом [PrankWeb](#), який забезпечує інтерфейс для P2Rank. P2Rank – це безкоштовне, швидке програмне забезпечення з відкритим кодом на основі машинного навчання, що має простий користувацький інтерфейс. Інструмент дозволяє передбачати сайти зв'язування, базуючись на структурі протеїну. Для ідентифікації можливих зв'язувальних кишень необхідно лише завантажити протеїн в форматі PDB, чи вказавши його PDB ID [64,65].

Для передбачення сайтів зв'язування на поверхні hTR був використаний онлайн-сервіс [RBinds](#) – надійний і швидкий інструмент для знаходження РНК сайтів. RBinds дозволяє: 1) автоматично трансформувати РНК структуру до мережі; 2) передбачити потенційні сайти зв'язування аналізуванням структурної мережі; 3) створити силово-спряжену мережу; 4) візуалізувати структуру; 5) запропонувати аналогічні інструменти для аналізу [66].

2.4. Програмне забезпечення для підготовки молекул до докінгу

Для підготовки ензиму з інгібітором використовувалось безкоштовне програмне забезпечення (сет) з відкритим кодом AutoDock, яке дозволяє проводити молекулярний докінг малих молекул до макромолекулярних рецепторів. Сет включає декілька програм для роботи, серед них AutoDock – програма, що обчислює докінг на основі емпіричної вільної енергії силового поля та швидкого методу пошуку генетичного алгоритму Ламарка; AutoDock Vina – обчислювальна програма для докінгу, що ґрунтується на використанні функції скорингу та конформаційному пошукові градієнтної оптимізації. AutoDock Vina, як і звичайний AutoDock, був розроблений для виконання базових докінгових операцій. У порівнянні з AutoDock, AutoDock Vina швидший, високо оптимізований для проведення докінгових задач, не

передбачає експертних знань від виконавця; AutoDock Tools – інтерактивний графічний застосунок, що дозволяє підготувати молекулу до докінгу [53, 57].

2.5. Візуалізація результатів

Редагування молекули протеїну, візуалізація даних, отриманих після проведення докінгу відбувалося в PyMOL та Biovia Discovery Studio [67]. PyMOL – кросплатформне програмне забезпечення з відкритим кодом, розроблене компанією Schrödinger Inc. Програма дозволяє користувачам самостійно вдосконалювати її функціонал за допомогою зовнішніх скриптів та плагінів [68]. Biovia Discovery Studio – програма для виконання різноманітних задач *in silico* [76,77].

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення сайтів зв'язування на поверхні hTERT та hTR

За допомогою сервісу PrankWeb був визначений 21 потенційний сайт зв'язування на поверхні hTERT (рис.3.1). Також були отримані хуз координати даних сайтів.

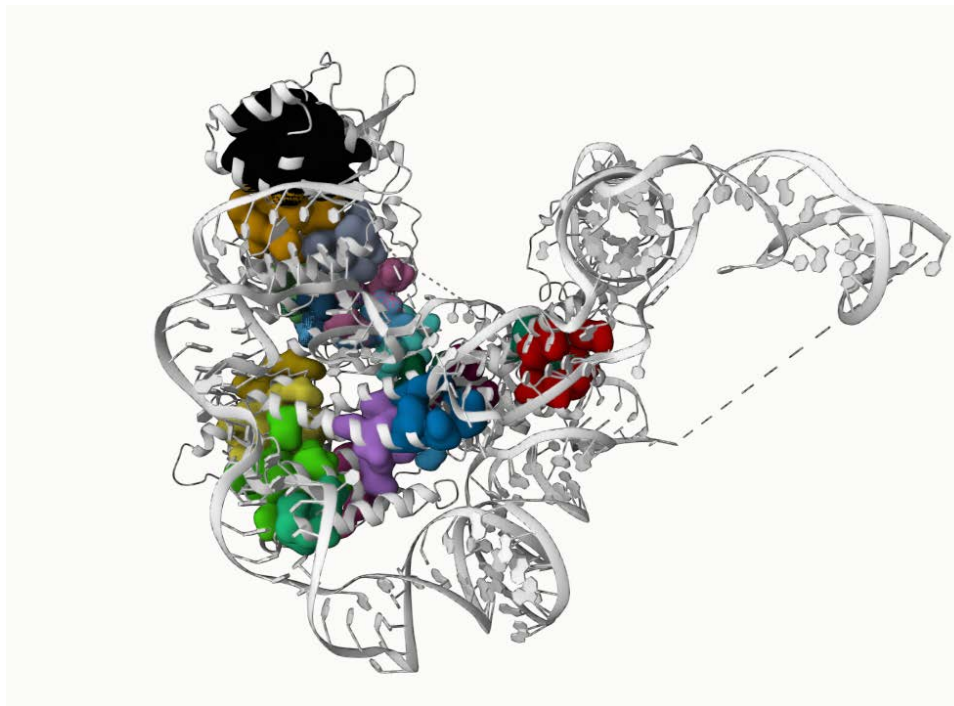


Рис.3.1 – Визначення сайтів зв'язування на поверхні hTERT онлайн-сервісом PrankWeb

Сервісом RBindс були отримані 11 потенційних сайтів зв'язування на поверхні hTR (рис.3.2).

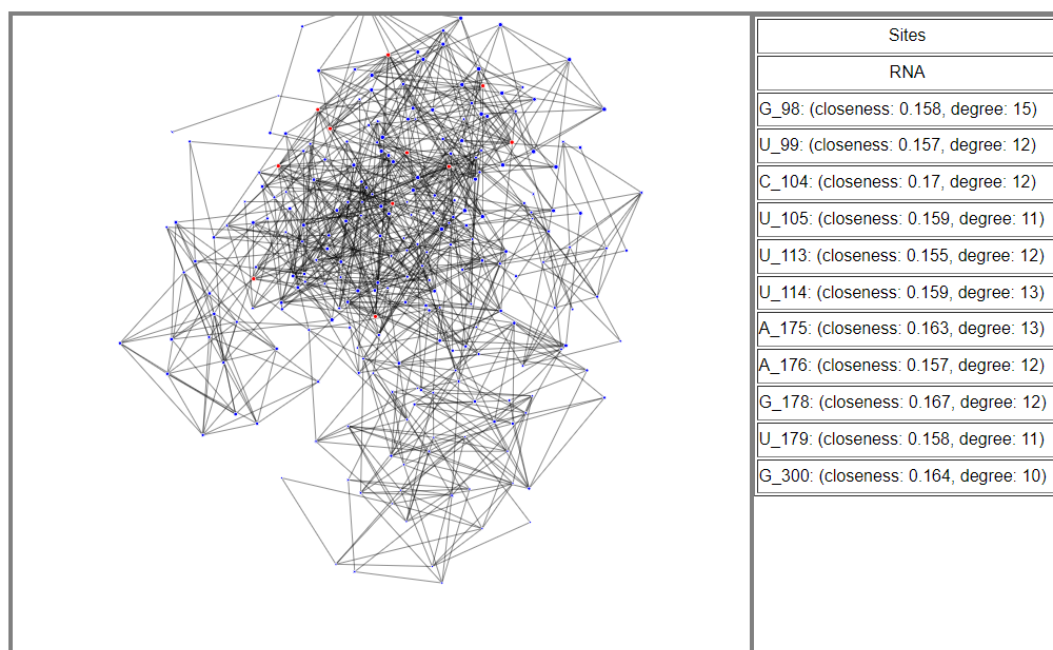


Рис.3.2 – Визначення сайтів зв’язування на поверхні hTR онлайн-сервісом RBinds

3.2. Підготовка рецептору та ліганду до докінгу

Для підготовки рецептору, фермент відкривали в AutoDock Tools у форматі `rbd`. Для подальшої роботи необхідне додавання атомів Гідрогену до сполуки, що було виконано. Після цього файл зберігався у форматі `pdbqt`, необхідному для роботи програми AutoDock Vina.

Важливим кроком було встановлення параметрів Grid Box – площі, що визначала область проведення докінгу інгібітору до ферменту. Центри Grid Box було встановлено в передбачених попередньо залишках. Для кожного сайту параметри встановлювалися окремо (рис.3.3). Розмір Grid Box встановлювався втричі більшим за радіус обертання ліганду (radius of gyration). ROG був розрахований з використанням програми VMD (Visual Molecular Dynamics) [69,70].

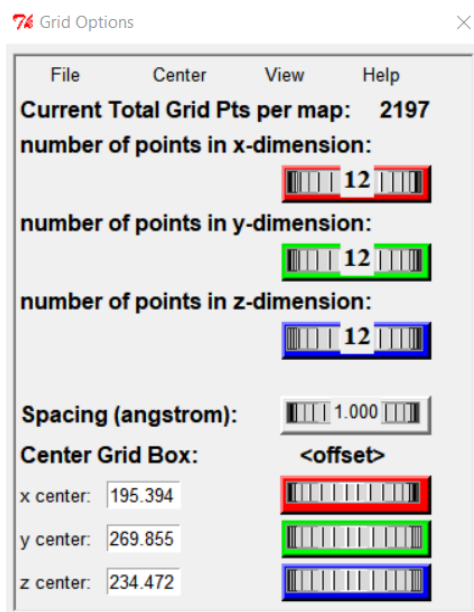


Рис.3.3 – Приклад параметрів Grid Box для кишені 1

У випадку (+)-катехіну, файл також відкривали у `rbf` форматі, який попередньо було переведено з формату `sdf`. Застосовувалась опція, що дозволяла налаштувати гнучкість ліганду, змінивши кількість зв'язків молекули, здатних до обертання. Зв'язки, що обертаються, позначалися зеленим кольором, жорсткі зв'язки, не здатні до обертання – червоним, такі, що потенційно обертаються – пурпуровим. Число зв'язків, що здатні до обертання, дорівнювало шести. Ліганд, як і рецептор, зберегли у форматі `pdbqt`.

3.3. Докінг hTERT

Результати аналізу 21 зв'язувального сайту наведено у таблиці 3.1. Для подальшого аналізу були відібрані результати лише з негативною афінністю. Повна таблиця результатів представлена в додатках.

Таблиця.3.1 – Результати докінгу hTERT з негативною афінністю

Номер сайту	Mode	Affinity (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
1	1	-6.4	0.000	0.000
	2	-6.4	3.575	6.450
	3	-6.0	3.182	6.768
	4	-6.0	3.262	7.198
	5	-5.9	3.962	7.464
	6	-5.9	3.921	7.240
	7	-5.9	1.857	7.170
	8	-5.9	3.019	7.149
	9	-5.8	2.910	4.333
3	1	-2.0	0.000	0.000
	2	-0.9	2.014	2.870
4	1	-7.0	0.000	0.000
	2	-6.8	1.272	2.846
	3	-6.7	2.123	2.898
	4	-6.5	2.126	6.587
	5	-6.3	1.741	6.902
	6	-6.2	2.529	6.804
	7	-6.2	2.247	3.703
	8	-6.2	1.704	6.879
	9	-6.0	2.435	3.572
7	1	-5.5	0.000	0.000
	2	-5.5	3.584	6.135
	3	-5.3	2.536	6.620
	4	-4.9	2.422	6.675

	5	-4.7	3.707	5.334
	6	-4.7	1.393	6.886
	7	-4.6	2.928	4.827
	8	-4.5	3.759	6.331
	9	-3.9	3.531	4.133
8	1	-5.9	0.000	0.000
	2	-5.6	1.314	6.884
	3	-5.6	6.884	2.783
	4	-5.1	2.247	6.705
	5	-5.1	2.384	6.765
	6	-4.9	2.373	7.346
	7	-4.7	2.085	2.496
	8	-4.7	2.407	3.401
	9	-4.5	3.635	6.853
9	1	-4.4	0.000	0.000
	2	-3.5	1.583	6.709
10	1	-4.7	0.000	0.000
	2	-4.1	0.822	1.540
	3	-3.7	1.556	3.160
12	1	-5.1	0.000	0.000
	2	-4.6	4.651	6.347
	3	-4.1	3.935	5.203
	4	-3.8	3.218	4.580
	5	-3.2	4.063	5.219
	6	-3.1	2.580	7.395
	7	-2.9	3.699	4.964
	8	-2.5	4.236	6.220

15	1	-5.6	0.000	0.000
	2	-5.5	1.872	7.176
	3	-5.4	2.017	6.653
	4	-4.6	1.267	2.724
	5	-3.9	2.200	6.875
	6	-2.8	2.651	6.422
16	1	-6.1	0.000	0.000
	2	-5.6	2.269	6.535
	3	-5.5	1.866	2.241
	4	-5.3	3.191	6.741
	5	-5.2	1.338	6.865
	6	-5.2	2.330	6.586
	7	-5.2	2.386	3.586
	8	-5.1	2.724	3.674
	9	-4.8	3.023	6.709

3.4. Докінг hTR

Результати окремого докінгу РНК представлені в таблиці 3.2.

Таблиця.3.2 – Результати докінгу hTR

Номер сайту	Mode	Affinity (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.
G98	1	-7.5	0.000	0.000
	2	-7.3	1.400	7.199
	3	-6.9	2.045	6.992
	4	-6.2	1.268	6.662

	5	-6.1	10.950	11.321
	6	-5.1	10.940	11.864
U99	1	-6.3	0.000	0.000
	2	-6.2	2.528	4.448
	3	-6.1	3.396	4.298
	4	-5.6	1.607	7.225
	5	-5.5	2.729	6.407
	6	-5.4	2.936	5.745
	7	-5.4	2.948	6.780
	8	-5.3	2.474	6.940
	9	-5.3	2.904	4.870
C104	1	-7.0	0.000	0.000
	2	-6.1	1.800	7.138
	3	-5.7	1.100	6.650
U105	1	-6.0	0.000	0.000
	2	-5.7	2.253	2.661
	3	-5.0	2.357	6.704
	4	-3.8	10.748	11.695
	5	-3.7	1.467	6.904
	6	-3.3	10.804	13.834
U113	1	-6.8	0.000	0.000
	2	-6.5	1.682	7.450
	3	-5.8	1.797	7.091
	4	-5.2	2.240	7.727
	5	-4.7	11.116	12.477
	6	-3.8	11.201	12.602
U114	1	-5.8	0.000	0.000

	2	-5.7	1.481	3.165
	3	-4.8	1.785	7.206
	4	-4.6	1.069	1.293
	5	-4.3	1.803	2.178
	6	-3.4	1.533	6.772
	7	-2.8	4.070	4.746
A175	1	-4.9	0.000	0.000
	2	-4.2	2.535	5.387
	3	-3.9	1.795	7.355
	4	-3.8	1.408	7.029
	5	-3.8	1.712	3.236
	6	-3.3	1.493	6.849
	7	-2.8	3.449	7.013
	8	-2.7	3.218	5.618
	9	-2.1	3.412	5.329
A176	1	-6.2	0.000	0.000
	2	-4.9	2.114	2.761
	3	-4.9	1.513	6.920
G178	1	-5.7	0.000	0.000
	2	-5.3	2.116	7.097
	3	-5.3	1.722	6.820
	4	-4.0	2.110	6.824
	5	-4.0	2.261	3.198
U179	1	-5.2	0.000	0.000
	2	-5.2	2.057	7.462
	3	-4.8	2.799	6.572
	4	-4.7	2.598	3.834

	5	-4.5	1.422	6.823
	6	-4.4	1.265	7.308
	7	-4.4	2.355	6.698
	8	-4.3	1.635	1.737
	9	-4.2	2.896	4.156
G300	1	-5.3	0.000	0.000
	2	-5.2	3.259	7.282
	3	-5.1	3.232	6.700
	4	-4.8	1.779	3.200
	5	-4.7	1.251	2.866
	6	-4.4	1.635	6.855
	7	-4.4	2.636	5.596
	8	-4.4	1.661	3.322
	9	-4.4	1.903	3.629

3.5. Перевірка сайтів зв'язування на перекривання і повторний докінг

Під час перевірки сайтів зв'язування на поверхні hTERT та hTR на накладання був виявлений лише один подібний сайт, що включав сайти A175, A176, U179, G178 та 7 зв'язувальну кишеню hTERT. Було проведено визначення залишків цих сайтів на наявність спільних, що можуть брати участь у взаємодії. Нуклеїновими залишками, що беруть участь у зв'язуванні ліганду сайту A175 є A174, THR-1088, VAL-1087, сайту A176 – U114, THR-1088, U114, VAL-1087, ARG-1086, A175, сайту U114 – U114, U113, A176, TRP-1026, THR-1088, U177, A176, сайту U179 – G178, C112, сайту G178 – G178, A176, U177, GLN-1024; амінокислотними залишками 7 зв'язувальної кишені є GLN1023, U307. Серед них для подальшого аналізу були відібрані A176, U114, THR1088 та VAL1087.

Також до перевірки на наявність спільних залишків були взяті сайти на поверхні hTERT, що знаходились близько один до одного: 1, 4 та 12 кишені; 10 та 16 кишені. Те ж саме було виконано і для сайтів hTR: U99 та U113; C104 та U105. Жодних спільних залишків не було ідентифіковано.

Отже, більш точний докінг був проведений у сайті, який охоплював залишки A176, U114, THR1088 та VAL1087. Результати докінгу наведені у таблиці 3.3.

Таблиця.3.3 – Результати повторного докінгу

Mode	Affinity (kcal/mol)	Rmsd l.b.	Rmsd u.b.
1	-7.6	0.000	0.000
2	-7.5	1.429	3.152
3	-7.5	2.426	7.029
4	-7.1	2.243	6.099
5	-6.6	1.531	3.469
6	-6.2	1.878	2.529
7	-5.1	2.743	4.962

Важливо зазначити, що RMSD (Root Mean Square Deviation) – середньоквадратичне відхилення, кількісна міра порівняння подібностей конформацій ліганду [73,74]. При розрахунку RMSD використовуються лише рухомі важкі атоми. Нижня (lower bound) і верхня (upper bound) межі RMSD відрізняються зіставленням атомів при розрахунку відстаней. До прикладу, при верхній межі RMSD кожен атом однієї конформації зіставляється з атомами попередньої конформації без урахування симетрії сполуки. При нижній межі RMSD порівняння відбувається з однаковими найближчими атомами

попередньої конформації [75]. Оскільки (+)-катехін не має внутрішньої симетрії, до уваги береться лише верхня межа RMSD. Межа RMSD в $\leq 2 \text{ \AA}$ вважається необхідним критерієм для передбачення структури [57]. Саме тому для подальшого аналізу конформації була взята лише перша позиція, оскільки RMSD другої відносно неї становило $> 2 \text{ \AA}$.

Визначеними залишками зв'язувального сайту, що беруть участь у взаємодії з лігандом є GLN1024, VAL1087, TRP1026, U113, U114, A176, U177, G178. Вид ліганду у зв'язувальному сайті, довжини зв'язків та їхні типи зображені на рисунках 3.4, 3.5, 3.6.

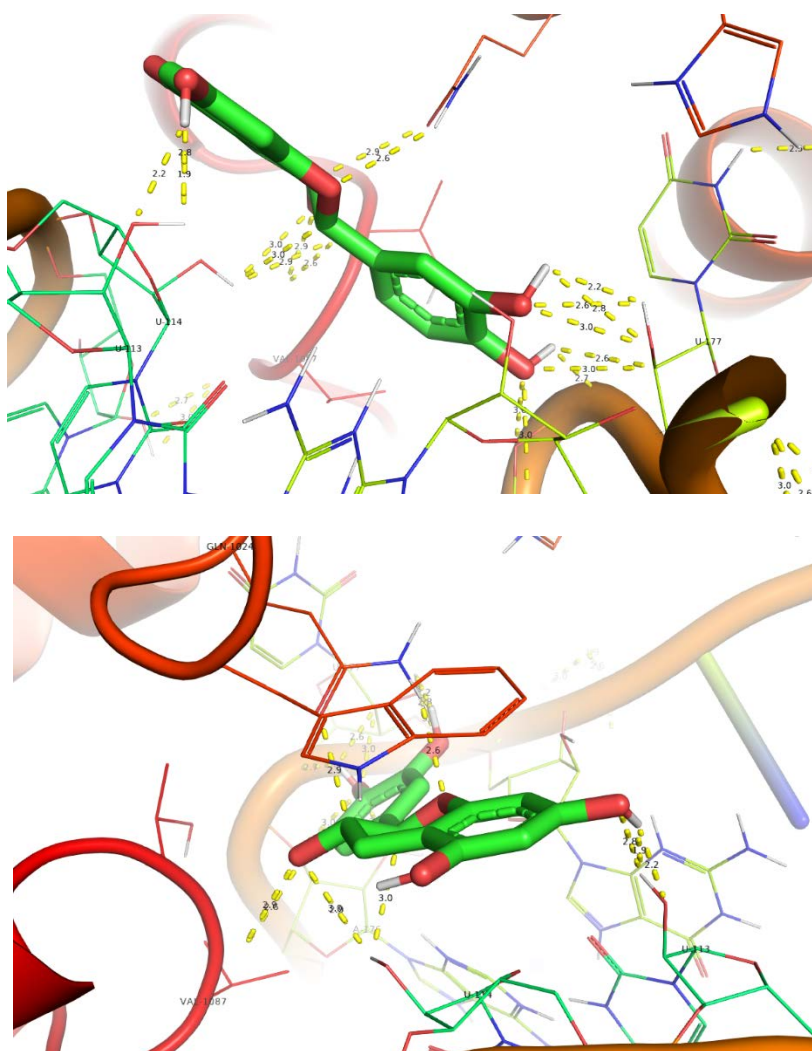


Рис.3.4 – Залишки зв'язувального сайту та довжини їхніх зв'язків

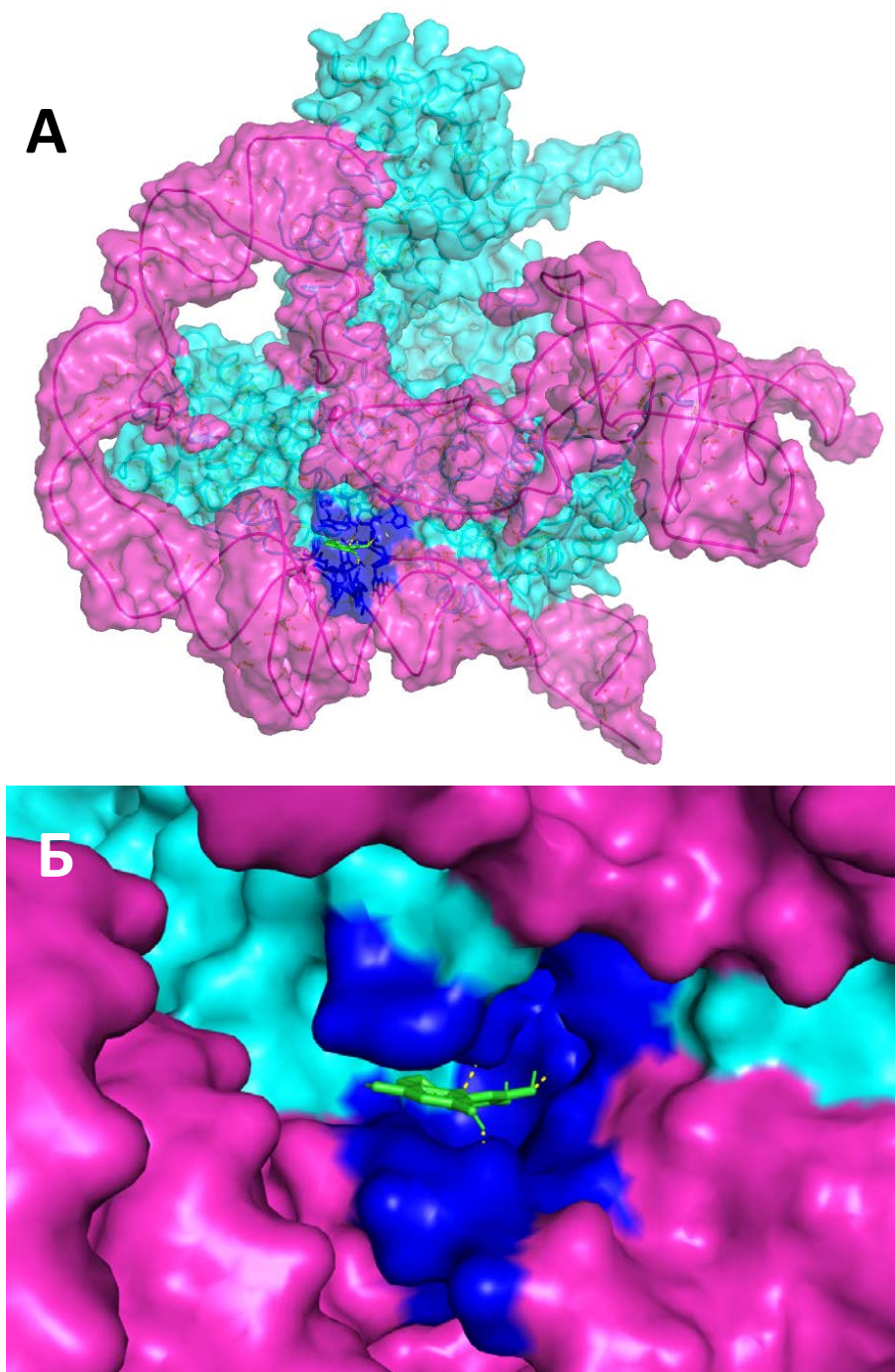


Рис.3.5 – Вид поверхні ензиму зі зв'язаним з ним лігандом. (А) Вид повної поверхні. (Б) Вид зв'язувального сайту. Зеленим кольором позначений ліганд, блакитним – hTERT, рожевим – hTR, синім – аміно- та нуклеїнові залишки ензиму, що взаємодіють з лігандом

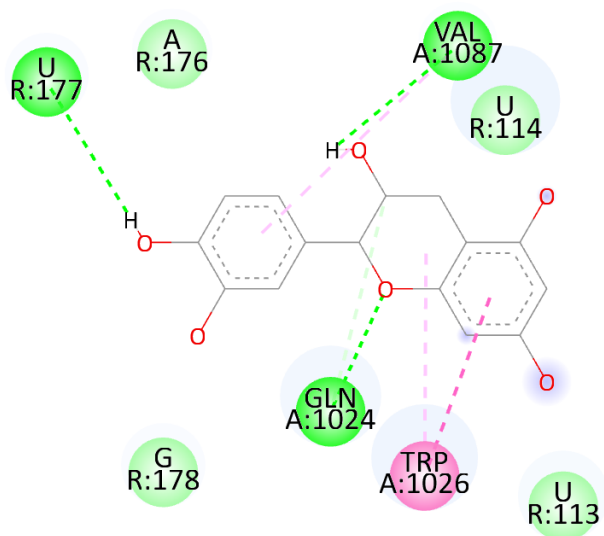


Рис.3.6 – Типи взаємодій ліганду з рецептором. Зелений – водневий зв’язок, світло-зелений – вандерваальсові взаємодії, рожевий – π - π стекінг, світло-рожевий – π -алкільний зв’язок

ВИСНОВКИ

1. Після отримання результату докінгового аналізу пропонується, що (+)-катехін взаємодіє з певними залишками малого жолобу РНК, а саме U113, U114, A176, U177, G178, та декількома амінокислотними залишками каталітичної одиниці теломерази: GLN1024, VAL1087, TRP1026.
2. Встановлено, що ліганд взаємодіє з VAL1087, GLN1024 та U177 за допомогою водневих зв'язків, з першим залишком, зокрема, за допомогою π -алкільного зв'язку; з U113, U114, A176, G178, GLN1024 – за допомогою вандерваальсових взаємодій; з TRP1026 за допомогою π - π стекінгу та π -алкільного зв'язку.
3. Залишки GLN1024, VAL1087, TRP1026 належать до STE-домени hTERT. Функцією цього домену є формування і стабілізація РНК-ДНК комплексу, а також забезпечення процесивності ферменту. Отже, при інгібуванні STE порушуватиметься утворення РНК-ДНК комплексу і знижуватиметься ефективність послідовного додавання нуклеотидів до теломер. Залишки U113, U114, A176, U177, G178 належать до домену псевдовузла hTR, мутації в якому призводять до інактивації ферменту, як-от A176 – відомо, що при мутації в цій позиції теломераза інактивується. Мутації як у домені STE, так і в домені псевдовузла пов'язані з функціонуванням такої хвороби, як дискератоз.
4. У перспективі може бути розглянута перевірка наведених вище аміно- та нуклеїнових залишків на їхню роль в інгібуванні теломерази (+)-катехіном за допомогою експресії hTERT та hTR зі змінами в позиціях цих залишків.

ПОДЯКА

Я хочу висловити подяку проф. Субсі Каляанамоортії за поради при виконанні роботи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Telomeres and telomerase: methods and protocols / edited by John A. Double and Michael J. Thompson.; cm. -- (Methods in molecular biology ; v. 191). 236 p.
2. Arvind, Kumar & Grace, Tony. (2018). Telomeres and Telomerase: Molecular Views and Perspectives. *Advances in Aging Research*. 07. 91-111. 10.4236/aar.2018.75008.
3. Tara L. Beattie, Wen Zhou, Murray O. Robinson, Lea Harrington, Reconstitution of human telomerase activity in vitro, *Current Biology*, Volume 8, Issue 3, 1998, Pages 177-180, ISSN 0960-9822, [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70067-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70067-3).
4. Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., & Allsopp, R. C. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, 269(5228). <https://doi.org/info:doi/>.
5. Blackburn, Elizabeth & Collins, Kathleen. (2011). Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3. 10.1101/cshperspect.a003558.
6. Bryan C, Rice C, Hoffman H, Harkisheimer M, Sweeney M, Skordalakes E. Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. *Structure*. 2015 Oct 6;23(10):1934-1942. doi: 10.1016/j.str.2015.08.006. Epub 2015 Sep 10. PMID: 26365799; PMCID: PMC4598299.
7. Chen JL, Blasco MA, Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*. 2000 Mar 3;100(5):503-14. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80687-x. PMID: 10721988.
8. Chen JL, Greider CW. Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita. *Trends Biochem Sci*. 2004 Apr;29(4):183-92. doi: 10.1016/j.tibs.2004.02.003. PMID: 15082312.

9. Jády BE, Bertrand E, Kiss T. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol.* 2004 Mar 1;164(5):647-52. doi: 10.1083/jcb.200310138. Epub 2004 Feb 23. PMID: 14981093; PMCID: PMC2172171.
10. Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis.* 2005 May;26(5):867-74. doi: 10.1093/carcin/bgh296. Epub 2004 Oct 7. PMID: 15471900.
11. Sauerwald A, Sandin S, Cristofari G, Scheres SH, Lingner J, Rhodes D. Structure of active dimeric human telomerase. *Nat Struct Mol Biol.* 2013 Apr;20(4):454-60. doi: 10.1038/nsmb.2530. Epub 2013 Mar 10. PMID: 23474713; PMCID: PMC3785136.
12. Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(17):5609-22. doi: 10.1093/nar/gkq370. Epub 2010 May 11. PMID: 20460453; PMCID: PMC2943602.
13. Mitchell M, Gillis A, Futahashi M, Fujiwara H, Skordalakes E. Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol.* 2010 Apr;17(4):513-8. doi: 10.1038/nsmb.1777. Epub 2010 Mar 28. PMID: 20357774.
14. Wang Y, Sušac L, Feigon J. Structural Biology of Telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Dec 2;11(12):a032383. doi: 10.1101/cshperspect.a032383. PMID: 31451513; PMCID: PMC6886448.
15. Dratwa M, Wysoczańska B, Łacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. TERT-Regulation and Roles in Cancer Formation. *Front Immunol.* 2020 Nov 19;11:589929. doi: 10.3389/fimmu.2020.589929. PMID: 33329574; PMCID: PMC7717964.
16. ClinicalTrials.gov Database. (2020). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02293707>.

17. Xu Y, Goldkorn A. Telomere and Telomerase Therapeutics in Cancer. *Genes (Basel)*. 2016 May 26;7(6):22. doi: 10.3390/genes7060022. PMID: 27240403; PMCID: PMC4929421.
18. Ivancich M, Schrank Z, Wojdyla L, Leviskas B, Kuckovic A, Sanjali A, Puri N. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants (Basel)*. 2017 Feb 19;6(1):15. doi: 10.3390/antiox6010015. PMID: 28218725; PMCID: PMC5384178.
19. Fekrmandi, Fatemeh & Kompany-Zareh, Mohsen & Biglari, Alireza & L, Hasani. (2011). Colorimetric Detection and Quantification of Small Anti-Cancer Drug Molecules based on G-Quadruplex Binding, using Unmodified Gold Nanoparticles. *Cell Journal (Yakhteh)*. 13.
20. Sun, Z. Y., Wang, X. N., Cheng, S. Q., Su, X. X., & Ou, T. M. (2019). Developing Novel G-Quadruplex Ligands: from Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid-Protein Interaction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3), 396. <https://doi.org/10.3390/molecules24030396>.
21. Fragkiadaki P, Renieri E, Kalliantasi K, Kouvidi E, Apalaki E, Vakonaki E, Mamoulakis C, Spandidos DA, Tsatsakis A. Telomerase inhibitors and activators in aging and cancer: A systematic review. *Mol Med Rep*. 2022 May;25(5):158. doi: 10.3892/mmr.2022.12674. Epub 2022 Mar 10. PMID: 35266017; PMCID: PMC8941523.
22. Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol*. 2003 Sep;9(9):1930-4. doi: 10.3748/wjg.v9.i9.1930. PMID: 12970878; PMCID: PMC4656646.
23. Pandya VA, Crerar H, Mitchell JS, Patani R. A Non-Toxic Concentration of Telomerase Inhibitor BIBR1532 Fails to Reduce *TERT* Expression in a Feeder-Free Induced Pluripotent Stem Cell Model of Human Motor Neurogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 23;22(6):3256. doi: 10.3390/ijms22063256. PMID: 33806803; PMCID: PMC8005146.

24. Harrington L. Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer Lett.* 2003 May 15;194(2):139-54. doi: 10.1016/s0304-3835(02)00701-2. PMID: 12757972.
25. Al-Karmalawy, Ahmed & Nafie, Mohamed & Shaldam, Moataz & Abo Elmaaty, Ayman & Antar, Samar & El-Hamaky, Anwar & Saleh, Mohamed & Elkamhawy, Ahmed & Tawfik, Haytham. (2022). Ligand-Based Design on the Dog-Bone-Shaped BIBR1532 Pharmacophoric Features and Synthesis of Novel Analogues as Promising Telomerase Inhibitors with In Vitro and In Vivo Evaluations. *Journal of Medicinal Chemistry.* 10.1021/acs.jmedchem.2c01668.
26. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
27. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011 Feb 21;192(4):547-56. doi: 10.1083/jcb.201009094. Epub 2011 Feb 14. PMID: 21321098; PMCID: PMC3044123.
28. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2463-79. doi: 10.1101/gad.1971610. PMID: 21078816; PMCID: PMC2975923.
29. Hoare, M., & Narita, M. (2018). The power behind the throne; senescence and the hallmarks of cancer. *Annual Review of Cancer Biology* <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050352>
30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PMID: 10647931.
31. Marescal O, Cheeseman IM. Cellular Mechanisms and Regulation of Quiescence. *Dev Cell.* 2020 Nov 9;55(3):259-271. doi: 10.1016/j.devcel.2020.09.029. PMID: 33171109; PMCID: PMC7665062.
32. Li, L., Zhao, G. D., Shi, Z., Qi, L. L., Zhou, L. Y., & Fu, Z. X. (2016). The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and

- development of HCC. *Oncology letters*, 12(5), 3045–3050.
<https://doi.org/10.3892/ol.2016.5110>
33. Bardeesy, N., & Sharpless, N. E. (2006). RAS unplugged: negative feedback and oncogene-induced senescence. *Cancer cell*, 10(6), 451–453.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.015>
34. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
35. Grabowski, M. M., Sankey, E. W., Ryan, K. J., Chongsathidkiet, P., Lorrey, S. J., Wilkinson, D. S., & Fecci, P. E. (2021). Immune suppression in gliomas. *Journal of neuro-oncology*, 151(1), 3–12.
<https://doi.org/10.1007/s11060-020-03483-y>
36. Yin, K., Patten, D., Gough, S., de Barros Gonçalves, S., Chan, A., Olan, I., Cassidy, L., Poblocka, M., Zhu, H., Lun, A., Schuijs, M., Young, A., Martinez-Jimenez, C., Halim, T. Y. F., Shetty, S., Narita, M., & Hoare, M. (2022). Senescence-induced endothelial phenotypes underpin immune-mediated senescence surveillance. *Genes & development*, 36(9-10), 533–549.
<https://doi.org/10.1101/gad.349585.122>
37. Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* 2006 May 19;34(9):2723-35. doi: 10.1093/nar/gkl348. PMID: 16714449; PMCID: PMC1464114.
38. Fan, H. C., Chang, F. W., Tsai, J. D., Lin, K. M., Chen, C. M., Lin, S. Z., Liu, C. A., & Harn, H. J. (2021). Telomeres and Cancer. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(12), 1405. <https://doi.org/10.3390/life11121405>
39. С34 Молекулярна біологія : підручник / А.В. Сиволоб. – К. : Видавничополіграфічний центр “Київський університет”, 2008. – 384 с.

40. Gavory, G., Farrow[21, M., & Balasubramanian, S. (2002). Minimum length requirement of the alignment domain of human telomerase RNA to sustain catalytic activity in vitro. *Nucleic acids research*, 30(20), 4470–4480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf575>
41. Eboji, O. K., Borges, G., Harrington, L., Lin, W., Sofidiya, M. O., & Sowemimo, A. A. (2021). Catechin from *Burkea africana* Hook. Exhibits *in vitro* inhibition of human telomerase activity. *Natural product research*, 35(24), 6175–6179. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1831497>
42. Naasani, I., Seimiya, H., & Tsuruo, T. (1998). Telomerase inhibition, telomere shortening, and senescence of cancer cells by tea catechins. *Biochemical and biophysical research communications*, 249(2), 391–396. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9075>
43. Yang, C. S., Sang, S., Lambert, J. D., Hou, Z., Ju, J., & Lu, G. (2006). Possible mechanisms of the cancer-preventive activities of green tea. *Molecular nutrition & food research*, 50(2), 170–175. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500105>
44. Beltz, L. A., Bayer, D. K., Moss, A. L., & Simet, I. M. (2006). Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 6(5), 389–406. <https://doi.org/10.2174/187152006778226468>
45. Srinivas, Keerthi & J.W, King & Howard, Luke & Monrad, Jeana. (2010). Solubility of Gallic Acid, Catechin, and Protocatechuic Acid in Subcritical Water from (298.75 to 415.85) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 55. 3101-3108. 10.1021/je901097n.
46. Huo, Qing & Hao, Jing & Shi, Rongjian. (2013). Determination of Catechin by High Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Spectrophotometer. *Asian Journal of Chemistry*. 25. 8940-8942. 10.14233/ajchem.2013.14923.

47. Bentz, E.N., Pomilio, A.B. & Lobayan, R.M. Exploratory conformational study of (+)-catechin. Modeling of the polarizability and electric dipole moment. *J Mol Model* **20**, 2522 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00894-014-2522-z>
48. Donovan, J. L., Crespy, V., Oliveira, M., Cooper, K. A., Gibson, B. B., & Williamson, G. (2006). (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free radical research*, *40*(10), 1029–1034. <https://doi.org/10.1080/10715760600868545>
49. Lamuela-Raventós, Rosa M & Romero-Pérez, A.I. & Andres-Lacueva, Cristina & Tornero, A.. (2005). Review: Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International - FOOD SCI TECHNOL INT.* *11*. 159-176. [10.1177/1082013205054498](https://doi.org/10.1177/1082013205054498).
50. PDB ID: 7V99
- DOI Citation: Wan, F., Ding, Y., Zhang, Y., Wu, Z., Li, S., Yang, L., Yan, X., Lan, P., Li, G., Wu, J., & Lei, M. (2021). Zipper head mechanism of telomere synthesis by human telomerase. *Cell research*, *31*(12), 1275–1290. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00586-7>
51. Zardecki, C., Dutta, S., Goodsell, D., Voigt, M., & Burley, S. (2016). RCSB Protein Data Bank: A Resource for Chemical, Biochemical, and Structural Explorations of Large and Small Biomolecules. *Journal of Chemical Education*, *93*(3), 569-575.
52. RCSB PDB: <https://www.rcsb.org/ligand/KXN>
53. Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature protocols*, *11*(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

54. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins*, *47*(4), 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
55. Li, J., Fu, A. & Zhang, L. An Overview of Scoring Functions Used for Protein–Ligand Interactions in Molecular Docking. *Interdiscip Sci Comput Life Sci* **11**, 320–328 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12539-019-00327-w>
56. Sheng-You Huang, Comprehensive assessment of flexible-ligand docking algorithms: current effectiveness and challenges, *Briefings in Bioinformatics*, Volume 19, Issue 5, September 2018, Pages 982–994, <https://doi.org/10.1093/bib/bbx030>
57. O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry* *31* (2010), 455–461, DOI 10.1002/jcc.21334
58. Li, Y., & Tergaonkar, V. (2014). Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer research*, *74*(6), 1639–1644. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3568>
59. Romaniuk, A., Paszel-Jaworska, A., Totoń, E. *et al.* The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off. *Mol Biol Rep* **46**, 1401–1411 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4496-x>
60. Ségal-Bendirdjian, E., & Geli, V. (2019). Non-canonical Roles of Telomerase: Unraveling the Imbroglia. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 332. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00332>
61. Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(20), 5546–5553. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>

62. Chu, T. W., D'Souza, Y., & Autexier, C. (2015). The Insertion in Fingers Domain in Human Telomerase Can Mediate Enzyme Processivity and Telomerase Recruitment to Telomeres in a TPP1-Dependent Manner. *Molecular and cellular biology*, 36(1), 210–222. <https://doi.org/10.1128/MCB.00746-15>
63. Udroi, I., Marinaccio, J., & Sgura, A. (2022). Many Functions of Telomerase Components: Certainties, Doubts, and Inconsistencies. *International journal of molecular sciences*, 23(23), 15189. <https://doi.org/10.3390/ijms232315189>
64. Lukáš Jendele and Radoslav Krivák and Petr Škoda and Marian Novotný and David Hoksza, PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization, *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, 02 July 2019, Pages W345–W349, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz424>
65. Krivák, R., Hoksza, D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. *J Cheminform* 10, 39 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0285-8>
66. Wang H, Zhao Y. RBinds: A user-friendly server for RNA binding site prediction. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Nov 24;18:3762-3765. doi:10.1016/j.csbj.2020.10.043. PMID: 34136090; PMCID: PMC8164131.
67. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5 Schrödinger, LLC. Retrieved from <https://pymol.org/>
68. Rosignoli, S., & Paiardini, A. (2022). Boosting the Full Potential of PyMOL with Structural Biology Plugins. *Biomolecules*, 12(12), 1764. <https://doi.org/10.3390/biom12121764>
69. Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
70. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

71. Dey, A., & Chakrabarti, K. (2018). Current Perspectives of Telomerase Structure and Function in Eukaryotes with Emerging Views on Telomerase in Human Parasites. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 333. <https://doi.org/10.3390/ijms19020333>
72. Hossain, S., Singh, S., & Lue, N. F. (2002, September). Functional Analysis of the C-terminal Extension of Telomerase Reverse Transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36174–36180. <https://doi.org/10.1074/jbc.m201976200>
73. Lohning, A. E., Levonis, S. M., Williams-Noonan, B., & Schweiker, S. S. (2017). A Practical Guide to Molecular Docking and Homology Modelling for Medicinal Chemists. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(18), 2023–2040. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170130110827>
74. Kirchmair, J., Markt, P., Distinto, S., Wolber, G., & Langer, T. (2008). Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection--what can we learn from earlier mistakes?. *Journal of computer-aided molecular design*, 22(3-4), 213–228. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9163-6>
75. M. A. (2020, December 5). Manual. AutoDock Vina. <https://vina.scripps.edu/manual/>
76. BIOVIA, Dassault Systèmes, Biovia Discovery Studio, 2021, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.
77. *BIOVIA Discovery Studio - BIOVIA - Dassault Systèmes®*. (n.d.). BIOVIA Discovery Studio - BIOVIA - Dassault Systèmes®. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio>.

ДОДАТОК 1

ДОДАТОК 1 до Таблиці 1.1. Результати докінгу hTERT

Номер сайту	mode	Affinity (kcal/mol)	Rmsd l.b.	Rmsd u.b.
1	1	-6.4	0.000	0.000
	2	-6.4	3.575	6.450
	3	-6.0	3.182	6.768
	4	-6.0	3.262	7.198
	5	-5.9	3.962	7.464
	6	-5.9	3.921	7.240
	7	-5.9	1.857	7.170
	8	-5.9	3.019	7.149
	9	-5.8	2.910	4.333
2	1	0.3	0.000	0.000
	2	1.1	1.450	7.008
	3	2.7	2.688	6.920
	5	2.7	3.046	3.915
3	1	-2.0	0.000	0.000
	2	-0.9	2.014	2.870
4	1	-7.0	0.000	0.000
	2	-6.8	1.272	2.846
	3	-6.7	2.123	2.898
	4	-6.5	2.126	6.587
	5	-6.3	1.741	6.902

	6	-6.2	2.529	6.804
	7	-6.2	2.247	3.703
	8	-6.2	1.704	6.879
	9	-6.0	2.435	3.572
5	1	2.7	0.000	0.000
	2	3.6	1.264	2.767
	3	4.5	4.130	5.616
6	1	9.3	0.000	0.000
	2	9.8	1.359	6.953
	3	10.1	1.384	6.974
	4	10.6	1.327	6.717
	5	10.8	0.711	1.539
	6	11.3	1.818	6.843
	7	11.8	6.843	2.563
7	1	-5.5	0.000	0.000
	2	-5.5	3.584	6.135
	3	-5.3	2.536	6.620
	4	-4.9	2.422	6.675
	5	-4.7	3.707	5.334
	6	-4.7	1.393	6.886
	7	-4.6	2.928	4.827
	8	-4.5	3.759	6.331
	9	-3.9	3.531	4.133
8	1	-5.9	0.000	0.000
	2	-5.6	1.314	6.884
	3	-5.6	6.884	2.783
	4	-5.1	2.247	6.705

	5	-5.1	2.384	6.765
	6	-4.9	2.373	7.346
	7	-4.7	2.085	2.496
	8	-4.7	2.407	3.401
	9	-4.5	3.635	6.853
9	1	-4.4	0.000	0.000
	2	-3.5	1.583	6.709
10	1	-4.7	0.000	0.000
	2	-4.1	0.822	1.540
	3	-3.7	1.556	3.160
11	1	11.0	0.000	0.000
12	1	-5.1	0.000	0.000
	2	-4.6	4.651	6.347
	3	-4.1	3.935	5.203
	4	-3.8	3.218	4.580
	5	-3.2	4.063	5.219
	6	-3.1	2.580	7.395
	7	-2.9	3.699	4.964
	8	-2.5	4.236	6.220
13	1	7.9	0.000	0.000
	2	8.8	1.669	7.230
	3	9.0	1.526	7.085
14	1	7.6	0.000	0.000
15	1	-5.6	0.000	0.000
	2	-5.5	1.872	7.176
	3	-5.4	2.017	6.653
	4	-4.6	1.267	2.724

	5	-3.9	2.200	6.875
	6	-2.8	2.651	6.422
16	1	-6.1	0.000	0.000
	2	-5.6	2.269	6.535
	3	-5.5	1.866	2.241
	4	-5.3	3.191	6.741
	5	-5.2	1.338	6.865
	6	-5.2	2.330	6.586
	7	-5.2	2.386	3.586
	8	-5.1	2.724	3.674
	9	-4.8	3.023	6.709
17	1	9.7	0.000	0.000
	2	10.4	0.674	1.509
	3	11.2	1.165	6.805
18	1	12.1	0.000	0.000
	2	12.2	2.714	6.708
	3	13.6	5.653	7.879
	4	13.9	2.881	6.430
	5	14.4	3.250	5.657
19	1	14.1	0.000	0.000
	2	16.4	1.014	6.758
20	1	5.6	0.000	0.000
	2	7.9	1.684	2.206
21	1	20.5	0.000	0.000
	2	20.6	1.411	6.698
	3	22.1	1.690	7.218
	4	22.4	1.380	6.834

	5	22.6	1.600	7.343
--	---	------	-------	-------