

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Навчально-науковий інститут високих технологій

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики доцент **Нипорко Олексій Юрійович**
протокол №____ засідання кафедри
від “ ____ ” _____ 2022р

ДИЗАЙН, СИНТЕЗ ТА СКРИНІНГ ПЕПТИДНИХ ЛІГАНДІВ SIRT1

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра:

студента спеціальності: 091 Біологія

ОП Біологія (високі технології)

Бешкарєва Гліба Вікторовича

Науковий керівник:

професор кафедри молекулярної біотехнології

та біоінформатики д.б.н.

Цимбалюк Ольга Володимирівна

Оцінка захисту роботи

Київ– 2022 р.

Реферат

Сіртуїни - сімейство гістондеацетилаз третього типу, що мають НАД-залежний механізм деацетилювання та структурно відрізняються від інших гістондеацетилаз. Вони можуть бути знайдені в усіх царствах живого і приймають участь у таких важливих процесах, як репарація ДНК та регуляція метаболізму вуглеводів та жирних кислот.

Інтенсифікація досліджень сіртуїнів, старт клінічних випробувань селісістату - інгібітору SIRT1 - та глибока загальна фізіологічна роль цього сімейства протеїнів стали підставою для проведення дослідження з метою розробки, синтезу та скринінгу пептидних лігандів SIRT1.

В даній роботі представлено загальний огляд нормальної фізіологічної ролі сіртуїнів, їхньої ролі в патогенезі низки хвороб, структури, функцій сіртуїнів та короткого переліку описаних в науковій літературі лігандів. В результаті проведення роботи було запропоновано шлях препаративного синтезу селісістату, синтезовано та протестовано низку лігандів пептидної природи.

Ключові слова: дизайн, синтез, скринінг, пептидні ліганди, SIRT1.

Зміст

Перелік умовних скорочень	3
Вступ	4
Розділ 1. Огляд літератури	6
1.1. Роль гістонів у організації геному	6
1.2. N-ацетилювання як інструмент регуляції активності певних ділянок геному	7
1.3 Структура та ензиматична дія сіртуїнів	10
1.4. Роль сіртуїнів у регуляції енергетичного обміну	13
1.5. Вплив сіртуїнів на репарацію ДНК та стабільність геному	14
1.6. Сіртуїни та вікові захворювання	14
1.7. Пептидні та низькомолекулярні ліганди сіртуїнів	16
Розділ 2. Об'єкт, методи та матеріали дослідження	19
2.1. Об'єкт дослідження	19
2.2. Методи дослідження	20
2.2.1. Високоєфективна рідинна хроматографія, спряжена з мас-спектроскопією	20
2.2.2. SIRT-Glo метод	21
Розділ 3. Матеріали та їх обговорення	24
3.1. Аналітичні результати	24
3.2. Результати скрінінгу модифікованих НЗК9	24
3.3. Метод синтезу селісістату	25
Висновки	27
Список використаних джерел	28

Перелік умовних скорочень

АТФ- adenosine triphosphate- аденозин трифосфат

АДП- adenosine dihosphate- аденозин дифосфат

ДНК- дезоксирибонуклеїнова кислота

SAR- structure-activity relationship- взаємозв'язок структура-активність

НАТ- histone acetyltransferase- ацетилтрансфераза гістонів

HDAC- histone deacetylase- деацетилаза гістонів

Ас-СоА- acetyl-coenzyme A- ацетил конзим А

ADH2- alcoholdehydrogenase 2 - алкогольдегідрогеназа 2

мРНК- матрична рибонуклеїнова кислота

SANA- suberoanilide of hydroxamic acid - субероанлід гідроксамової кислоти

НАД- никотинамідаденіндинуклеотид

Gly- glycine- гліцин

PPI- protein-protein interaction- взаємодії протеїн-протеїн

PPAR- peroxisome proliferator-activated receptor - рецептор, що активується пероксисомним проліфератором

АМПК- adenosinmonophosphate activated protein kinase- протеїнкіназа, що активується аденозинмонофосфатом

LXR- liver X receptor- печінковий X рецептор

eNOS- endothelial NO-synthase-ендотеліальна NO-синтаза

Вступ

Філогенетично давнє сімейство гістондеацетилаз, відоме як сіртуїни, набуває дедалі більшої популярності у сучасній біологічній та фармакологічній спільноті. За останні десятиріччя було проведено численні дослідження, які висвітлюють специфічну роль сіртуїнів на різних рівнях.

На біохімічному рівні SIRT-протеїни приймають участь у регуляції інтенсивності метаболізму (а саме - енергетичного заряду клітини, тобто співвідношення [ATP]/[ADP]), гліколізу, глюконеогенезу, циклу Кребса та ліпідного обміну; молекулярно біологічна складова фізіологічної ролі сіртуїнів полягає у регуляції активності транскрипції широкого спектру генів шляхом деацетилювання гістонів та транскрипційних факторів та участі в процесі репарації ДНК. Цитологічна активність білків сімейства SIR2 проявляється в регуляції фаз клітинного циклу та контролю за процесами формування амілоїдних бляшок у нейронах, апоптозу, стресового відгуку тощо.

Таким чином, можна бачити, що сіртуїни, являючи собою протеїни філогенетично надзвичайно давні, виконують фундаментальні функції на всіх рівнях клітинної організації, що підкреслює їхню важливу роль у явищах енергетичного обміну, старіння та клітинної смерті, а здатність сіртуїнів до участі у білок-білкових взаємодіях багаторазово розширює спектр можливих патернів їхнього впливу на генетичні, біохімічні та клітинні процеси.

Широкий спектр молекулярно біологічних каскадів, у яких задіяні сіртуїни, є прямим свідоцтвом

Висока фізіологічна значущість сіртуїнів, підвищений інтерес до них та різноманітні, але багато в чому синергічні, функції стали підставами для проведення роботи з дизайну, синтезу та тестування біологічно активних лігандів сіртуїнів. Найбільш актуальними є протеїни ссавців, зокрема - людини. Саме тому в якості головного об'єкту дослідження було обрано людські сіртуїни, а саме hSIRT1. Оскільки природні субстрати hSIRT1 переважно являють собою білки, N-

ацетильовані за залишком лізину, логічним кроком у ході дослідження було сконцентрувати увагу на дослідженні лігандів саме пептидної природи.

Метою проведення даної роботи був дизайн, синтез та тестування на предмет біологічної активності лігандів білку SIRT1. Для реалізації мети було поставлено такі задачі:

- З метою валідації вже наявних результатів синтезувати, очистити та протестувати описані в науковій літературі ліганди.
- На основі отриманих даних за допомогою SAR та молекулярного докінгу запропонувати нові структури потенційних лігандів.
- Синтезувати, очистити та протестувати запропоновані потенційні ліганди.

Розділ 1

Огляд літератури

1.1. Роль гістонів у організації геному

Гістони - широкий клас ядерних білків, забезпечуючих структуру хроматину, упаковку ядерної ДНК тощо. Упаковка яДНК здійснюється за участі нуклеосом - октамерних білкових структур, представлених двома копіями гістонів H2A, H2B, H3 та H4. Навколо кожної нуклеосоми проведена нитка ДНК довжиною в 146 нуклеотидних залишків. Гістон H1 виконує функцію лінкера, що пов'язує ДНК з нуклеосомою. Окрім того, багаточисленні білки ядерного матриксу, які забезпечують функціонування допоміжних протеїнів, що обслуговують ДНК, також включають в себе гістони[1].

Широка розповсюдженість гістонів як структурних елементів хроматину витікає у можливість впливати на його стан шляхом хімічної модифікації гістонів. В переважаючій більшості гістонів у складі за кількістю домінують амінокислотні залишки лізину, що містять вільну бокову ϵ -аміногрупу, яка може бути ацетильована за участі НАТ (або деацетильована за участі HDAC) та Ас-СоА. Подібне перетворення первинної аміногрупи на амідну призводить не тільки до локальної зміни стеричних характеристик білку, а й до унеможливлення використання неподіленої електронної пари Нітрогену в якості акцепторів протонів - тобто, закислення середовища, - і вилучення атому Нітрогену з йонних взаємодій з рибонуклеїновими кислотами. Окрім того, фрагмент, що містить ацетильований лізин, може бути розпізнаний репресорами або індукторами транскрипції. Структурно ж N-ацетильовання залишків лізину загалом призводить до локального підвищення доступності хроматину для дії білків ядерного матриксу внаслідок зрівноваження заряду, наявного на аміногрупі.

Зміни в моделях посттрансляційних модифікацій гістонів часто пов'язують з канцерогенезом - як на глобальному рівні в геномі, так і в конкретних генних локусах.

Ці висновки з'явилися на основі більш ранніх, більш обґрунтованих висновків, що пов'язують метилювання ДНК з раком[2]. На додаток до нещодавніх проектів мапінгу посттрансляційних модифікацій, спроби секвенування також визначили багато ферментів, відповідальних за розміщення та видалення таких епігенетичних позначок. Виявляється, мутації в таких ферментах значно корелюють з розвитком раку. В сукупності ці результати показують взаємозв'язок між генетикою раку та епігенетикою гістонів, додаючи складності в сучасну картину розуміння онкогенного процесу. Успіхи в секвенуванні повного геному пухлин пацієнтів дозволили ідентифікувати можливі ключові епігенетичні чинники раку. Ці епігенетичні драйвери можуть приймати участь у сайленсингу генів-супресорів пухлин та активувати онкогени, забезпечуючи таким чином альтернативний механізм, за допомогою якого може відбуватися онкогенне перепрограмування геному. Геномні дослідження чітко показали, що порушення регуляції модифікаторів хроматину є рушійною силою багатьох типів раку, а повторні мутації відбуваються в генах, які кодують ферменти, які додають, видаляють та інтерпретують ковалентні модифікації гістонів.

1.2. N-ацетилювання як інструмент регуляції активності певних ділянок геному

Описаним в науковій літературі прикладом регуляції генетичних процесів за допомогою N-ацетилювання гістонових залишків є ген *ADH2 S.cerevisiae*. Експериментально було показано, що відсутність двох певних HDAC призводила до дестабілізації ТАТА box-вмісної нуклеосоми[3]. Це прискорювало взаємодію з транскрипційними факторами та призводило до акумуляції відповідної мРНК в клітині. Вилучення з постійного процесу ацетилювання та деацетилювання лізинових залишків НАТ, відповідальної за контроль над відповідною

нуклеосою, призвело, навпаки, до сповільнення темпів накопичення мРНК після дерепресії даної ділянки. Саме цей експеримент став першою експериментальною моделлю, яка *in vivo* підтвердила сам факт наявності взаємозв'язку між рівнем ацетилювання гістонів та активністю генів.

Під час реплікативного старіння в дріжджах рівні ацетилювання H3K56 знижуються, а рівні ацетильованого H4K16 збільшуються, що призводить до зміни структури теломерних повторів. Дослідження *in vivo* показало, що коли плодові мушки досягають середнього віку, конкретні місця ацетилювання змінюються в H3 і H4, що узгоджується зі змінами рівня ацетилювання гістонів у процесі старіння. Більше того, роль H4K16ac у старінні ссавців є досить унікальною через його здатність до підтримки

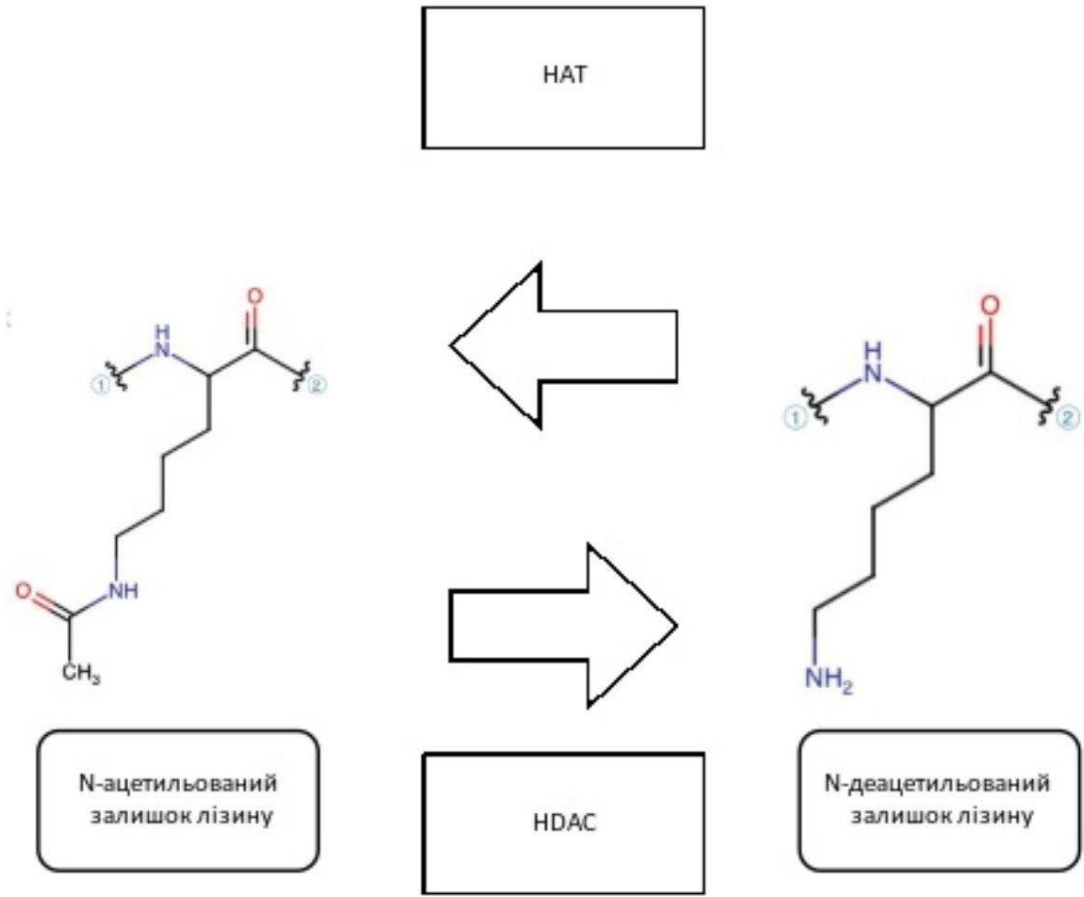


Рис. 1.1. Участь HAT та HDAC в ацетилюванні лізину

теломер. Зниження глобальних рівнів H4K16ac під час фізіологічного старіння та в моделі HGPS може бути пов'язане зі зменшенням зв'язку НАТ з ядерною периферією. Примітно, що в той час як клітинна аутофагія вважається однією з ознак старіння, дизрегуляція клітинної аутофагії була пов'язана зі збільшенням ацетилювання гістону H3 в старіючих дріжджах. Експресія генів, пов'язаних з аутофагією, посилюється завдяки підтримці рівнів ацетилювання гістону H3, що покращує аутофагію та продовжує тривалість життя дріжджів.

Дані показують, що ацетильовані гістони діють як молекулярні мнемоніки, і, таким чином, змінене ацетилювання гістонів може впливати на когнітивні та інші функції. Порушення пам'яті, пов'язані з віком, є наслідком порушення ацетилювання H4K12, що свідчить про те, що ацетилювання H4K12 може призвести до змін експресії генів і може служити раннім сигналом розвитку порушень пам'яті. Завдяки введенню інгібітора гістондеацетилази (HDACi), субероіланіліду гідроксамової кислоти (SAHA) у старих мишей дикого типу можна спостерігати підвищену стабільність рівня ацетилювання H4K12, що згодом призводить до покращення навчання та збереження функцій пам'яті. Попереднє дослідження повідомило, що підвищення рівня HDAC2 (що належить до HDAC класу II) в гіпокампі було пов'язано з порушенням когнітивних здібностей у літніх мишей. Таким чином, це нещодавнє дослідження додатково показало, що HDAC2 може негативно регулювати експресію нейрональних факторів синаптичної пластичності. Крім того, введення інгібіторів HDAC2 підтримувало експресію нейрональних факторів росту та захищало пам'ять літніх мишей. Однак інша група дослідників поставила під сумнів цю точку зору за допомогою моделі щурів, яка повторно оцінює вплив HDACi на пам'ять гіпокампу та когнітивне старіння. Обидва HDACi, EVX і бутират натрію, не змогли вплинути на збереження пам'яті під час тренування із контекстним страхом та вікових порушень просторової пам'яті. Ці суперечливі результати можуть бути пов'язані з різними типами HDACi, які вони обрали, або різними методами доставки, і, таким чином, можуть призвести до різного впливу на їхні цілі. Таким

чином, збереження специфічних епігенетичних ознак, а не глобальне підвищення регуляції ацетилювання гістонів гіпокампу може бути майбутнім напрямком прекогнітивного лікування HDACi при старінні. Примітно, що підвищені рівні H4K12ac спостерігалися при інших вікових явищах, таких як безпліддя мишей ооцитів та рак товстої кишки. Взявши їх разом, можна припустити, що ефекти певних типів ацетилювання гістонів можуть бути різними в різних тканинах. Тому фундаментальний молекулярний механізм між ацетилюванням гістонів і старінням потребує глибокого вивчення.

1.3 Структура та ензиматична дія сиртуїнів

За характером каталітичної дії сиртуїни належать до обширного класу HDAC - ензимів, що здатні до посттрансляційної модифікації (а саме - деацетилювання) гістонів. Структурно та функціонально вони виокремлюються у третю групу HDAC, оскільки мають низку значних відмінностей: наявність алостеричного сайту регуляції, афінного до нікотинаміду, НАД-залежний механізм деацетилювання тощо.

Аналіз послідовності сиртуїну вказує на те, що вони містять консервативну область каталітичного ядра, довжиною приблизно 275 амінокислот. Крім того, білки сиртуїну мають N- і C-кінцеві граничні області, які є змінними за довжиною та послідовністю[4,5]. Область каталітичного ядра приймає витягнуту форму, що містить об'ємний домен Россмана, характерний для білків, що зв'язують НАД⁺/НАДН; також виявлено більш структурно різноманітний, менший цинк-зв'язуючий домен і кілька послідовностей, що з'єднують ці два домени. Ці послідовності утворюють яскраво виражену розширену щілину між великим і малим доменами, куди входять пептидні субстрати, що містять ацетильований за ε-аміногрупою лізин. Амінокислоти, залучені до каталізу, знаходяться переважно в розщелині, яка

розташована між двома доменами. Таким чином, загальну структуру сіртуїнів можна описати через два домени - домен Россмана та цинк-зв'язуючий домен - і розщелину між ними.

Великий домен має класичну відкриту α/β -складку Россмана. Шість паралельних β -ланцюгів утворюють центральний β -лист, який затиснутий між кількома α -спіралями (точна кількість α -спіралей залежить від конкретного білка)[6]. Домен Россмана містить багато ознак типового сайту зв'язування НАД, таких як консервативна послідовність Gly-X-Gly, кишеня для розміщення молекули НАД+ та заряджені залишки, відповідальні за зв'язування рибозного фрагменту.

Малий цинк-зв'язуючий домен є набагато менш консервативним, аніж великий домен сіртуїнів, і варіює від одного білка до іншого. Два структурних модуля малого домену складаються з триланцюгового антипаралельного β -шару та варіабельної α -спіральної області, що залежить від конкретного білка[7]. Йон цинку пов'язаний сульфгідрильними групами двох пар суворо консервативних залишків цистеїну в β -листі в тетраедричній конформації[6]. Невеликий домен містить консервативний мотив послідовності, характерний для цинк-зв'язуючих послідовностей. Хоча йон цинку розташований занадто далеко від активного центру ферменту, щоб брати участь у каталізі, його присутність необхідна для активності деацетилази, оскільки мутація всіх чотирьох цинк-зв'язуючих цистеїнів або додавання хелатора цинку (офенантроліну) інгібує деацетилазну активність сіртуїнів *in vitro*[6]. Роль йона цинку є, судячи з усього, структурною; припускається, що він необхідний для утримання β -ланцюгів у малому домені разом. Однією з найцікавіших характеристик малого домену є філогенетично консервативний сольовий міст, який є важливим для взаємного розташування малого домену відносно великого[6, 8].

Чотири петлі, які з'єднують малий і великий домени, утворюють щілину, яка діє як активний центр ферменту. У цій щілині зв'язуються як субстрати НАД+, так і ацетильовані лізинові залишки. Ця область має найбільш гомологічну послідовність, і мутація кількох залишків у цій області порушує активність

гістондеацетилази, підкреслюючи важливість цієї послідовності в каталітичній дії сіртуїну.

Оскільки метою проведеної роботи є розробка та синтез пептидних лігандів сіртуїнів, детальніше розглянемо ключові сайти зв'язування, які можуть мати безпосередній вплив на активність білку: сайт зв'язування НАД⁺ та N-ацетиллізину.

Домен Россмана утворює частину сайту зв'язування НАД⁺, тоді як ділянки петлі, зокрема петля зв'язування кофактора, утворюють решту сайту зв'язування. При зв'язуванні з сіртуїном молекула НАД⁺ змінює конформацію на характерну до тієї, що звична до конформації при зв'язуванні з доменом Россмана.

Зв'язування власне пептидного субстрату відбувається з щілиною між малим і великим доменами, а бічний ланцюг ацетильованого лізину входить в гідрофобний тунель, розташований всередині щілини. Пептидний остов, що містить ацетил-лізиновий бічний ланцюг, утворює β -листоподібні взаємодії з двома граничними послідовностями ферменту. Атоми головного ланцюга пептиду створюють кілька водневих зв'язків з атомами основного ланцюга каталітичних залишків з граничних ланцюгів утвореного комплексу. Порівняння ферментів сіртуїну з і без зв'язаного пептиду, що містить ацетильований лізин, свідчить про те, що зв'язування пептиду викликає значний зсув у положенні малого домену відносно великого домену, об'єднуючи два домени разом, що призводить до правильного розташування консервативних залишків для утворення тунелю, який зв'язує ацетил-лізин. Було припущено, що зв'язування НАД⁺ і пептиду може бути спільним, оскільки область, що оточує сайт зв'язування пептиду, приймає більш закрити конформацію, яка спостерігається в структурі зв'язаного пептиду, коли НАД⁺ зв'язаний, але не за відсутності НАД⁺. Аліфатична область бічного ланцюга ацетил-лізину вступає у ван-дер-ваальсові взаємодії із консервативними гідрофобними залишками. Також припускається, що амідний зв'язок N-ацетиллізину вступає у водневі взаємодії з амінокислотними залишками в каталітичному сайті сіртуїну[9].

1.4. Роль сіртуїнів у регуляції енергетичного обміну

Безперечно, ключовими елементами енергетичного обміну є шляхи ана- та катаболізму вуглеводів та жирних кислот. Відомо, що важливу роль у регуляції цих процесів відіграє PPAR- γ - ядерний рецептор, здатний до взаємодії з низкою транскрипційних факторів. В числі протеїнів, до PPI з якими здатен PPAR- γ , є так званий PGC-1 α , що виступає субстратом для деацетилювання за участі hSIRT1[10, 11]. Кінцевим наслідком ланцюга цих білок-білкових взаємодій є індукція глюконеогенезу та інтенсифікація β -окиснення жирних кислот. Таким чином, між активністю hSIRT1 та інтенсивністю енергетичного обміну в організмі прослідковується чітка кореляція.

Очевидно, що метаболічні процеси, пов'язані з голодуванням, в першу чергу включають у себе глюконеогенез та β -окиснення жирних кислот - саме ті ключові шляхи енергетичного обміну, в яких задіяно вищезазначений PPAR- γ , у регуляції активності якого приймають участь білки SIR2. Окрім того, відомо, що сіртуїни приймають участь у регуляції метаболічних процесів не тільки через модуляцію глюконеогенезу, - також відмічається їхня участь у регуляції рівня глюкози в крові, опосередкована через контроль панкреатичної секреції інсуліну. Трансгенні миші з оверекспресією SIRT1 у панкреатичних β -клітинах мають значно вищу чутливість до стимульованої глюкозою секреції інсуліну в порівнянні з мишами з контрольної групи, в той час як нокаутовані за SIRT1 миші мали значні фізіологічні порушення контролю рівня глюкози за допомогою інсуліну[12, 13].

Однак слід зазначити, що роль сіртуїнів не обмежується участю в контролі процесів глюконеогенезу та окиснення жирних кислот: регуляція активності PGC-1 α також має вплив на процес мітохондріального біогенезу, ключовим регулятором яких є цей білок. Також варто звернути увагу на той факт, що незважаючи на те, що більшість досліджень сконцентровані на активності сіртуїнів у печінці та підшлунковій залозі, в умовах рестрикції споживання калорій експресія сіртуїнів спостерігається і в тканинах скелетних м'язів, і в деяких сполучних тканинах.

1.5. Вплив сіртуїнів на репарацію ДНК та стабільність геному

Відомо, що сіртуїни дріжджів здатні до інгібування рекомбінації рибосомальної ДНК[14], а також до релокалізації до сайтів порушення первинної структури ДНК. Безпосередньо гістондеацетилазна активність сіртуїнів також важлива для підтримки стабільності геному: емпірично встановлено, що її нестача призводить до дефектів, пов'язаних із сайленсингом, підвищення нестабільності геному та чутливості до ушкодження ДНК. Ці ефекти розповсюджуються не тільки на дріжджі: останні дослідження показують, що людський SIRT6 проявляє описану гістондеацетилазну активність у теломерах.

1.6. Сіртуїни та вікові захворювання

З огляду на велику кількість даних, які пов'язують сіртуїни з гомеостазом рівня глюкози в крові[15], було б логічно припустити, що ці білки можуть відігравати певну роль у розвитку інсулінової резистентності. Два нещодавні дослідження з використанням трансгенної надекспресії SIRT1 продемонстрували, що піддослідні тварини дійсно демонструють зміни у толерантності до глюкози на фоні підвищення рівня жиру в дієті. Цікаво, що ці два дослідження прийшли до двох різних висновків щодо впливу підвищеної експресії SIRT1 на баланс енергетичного обміну. На додаток до описаних цими дослідженнями фактів, пригнічення SIRT1 може штучно викликати інсулінорезистентність. Ці дані підтверджують думку про те, що вплив на активність SIRT1 може призвести до захисту від деяких метаболічних порушень. Піддослідні тварини, що приймали ресвератрол, який, за деякими даними, є активатором SIRT1, демонстрували підвищену стійкість до індукованого висококалорійною дієтою ожиріння. Однак слід зазначити, що активність ресвератролу як активатору сіртуїнів залишається спірною, в той час як фізіологічні ефекти можуть бути опосередковані через інші мішені. Наприклад, ресвератрол також активує шлях AMPK [16]. Втім,

використання замість ресвератролу інших, більш специфічних, активаторів сіртуїну, показало схожий ефект.

Сіртуїни також відіграють важливу роль у біології судин і можуть приймати участь у процесі розвитку вікового атеросклерозу. Частина цих ефектів може реалізувати себе через регуляцію метаболізму ліпідів і холестерину, в першу чергу через здатність SIRT1 модулювати активність ядерного рецептора LXR, що є вкрай важливим фактором транспорту холестерину[17]. SIRT1 також може деацетилувати та регулювати активність ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS), ключового регулятора судинного тону[18]. Додатковий інтерес до цих результатів пов'язаний з тим, що на лабораторних мишах було показано, що рестрикція калорій індукує мітохондріальний біогенез через eNOS-залежний шлях. З огляду на інтенсивні зміни в епігенетиці організму, що викликані обмеженням калорійності раціону, та активну участь у цьому процесі сіртуїнів, можна припустити, що саме eNOS-залежний шлях індукції мітохондріального біогенезу є основним посередником дії сіртуїнів у цьому процесі.

Існує обґрунтоване припущення про те, що SIRT1 може діяти як нетрадиційний пухлинний супресор; воно було частково підтверджене спостереженнями за лабораторними мишами, у яких недостатність SIRT1 призвела до збільшення утворення пухлини, тоді як надмірно експресований SIRT1 зменшив пухлини[19]. Крім того, надекспресія SIRT1 може інгібувати канцерогенез у мишачій моделі раку товстої кишки, викликаній конститутивною передачею сигналів. З огляду на те, що SIRT6 регулює репарацію ДНК і що активність SIRT2 необхідна для правильного цитокінезу, існує велика ймовірність того, що інші члени сімейства сіртуїнів також впливатимуть на схильність до раку, процес канцерогенезу та подальшого розвитку пухлини.

Спостереження щодо ролі сіртуїнів у генезі нейродегенеративних хвороб залишаються спірними, оскільки згідно до одних досліджень SIRT1 та SIRT2 у мишей як модельних організмів відігравали суттєву роль, а згідно до інших - існували повністю сіртуїн-незалежні механізми нейродегенерації у тих самих

моделях. Однак слід зазначити, що на мишачій моделі хвороби Альцгеймера надекспресія SIRT1 у тканинах мозку зменшує нейродегенерацію[20]. Дивно, але фармакологічне або генетичне інгібування SIRT2 також виявило нейропротективний ефект при дослідженні хвороби Паркінсона у дрозофіл. Ці результати свідчать про те, що підвищена активність SIRT1 або знижена активність SIRT2 зменшують нейродегенерацію, потенційно створюючи додаткові підстави для розробки фармацевтичних препаратів широкого спектру дії, основними мішенями яких будуть сіртуїни.

1.7. Пептидні та низькомолекулярні ліганди сіртуїнів.

Шляхом моделювання *in silico*, хімічного синтезу та подальшого скринінгу в різних дослідженнях було розроблено низку пептидних та низькомолекулярних лігандів сіртуїну[21, 22]. Найбільшу доказову базу з наявності біологічної активності має селісістат (EX527), який у більшості

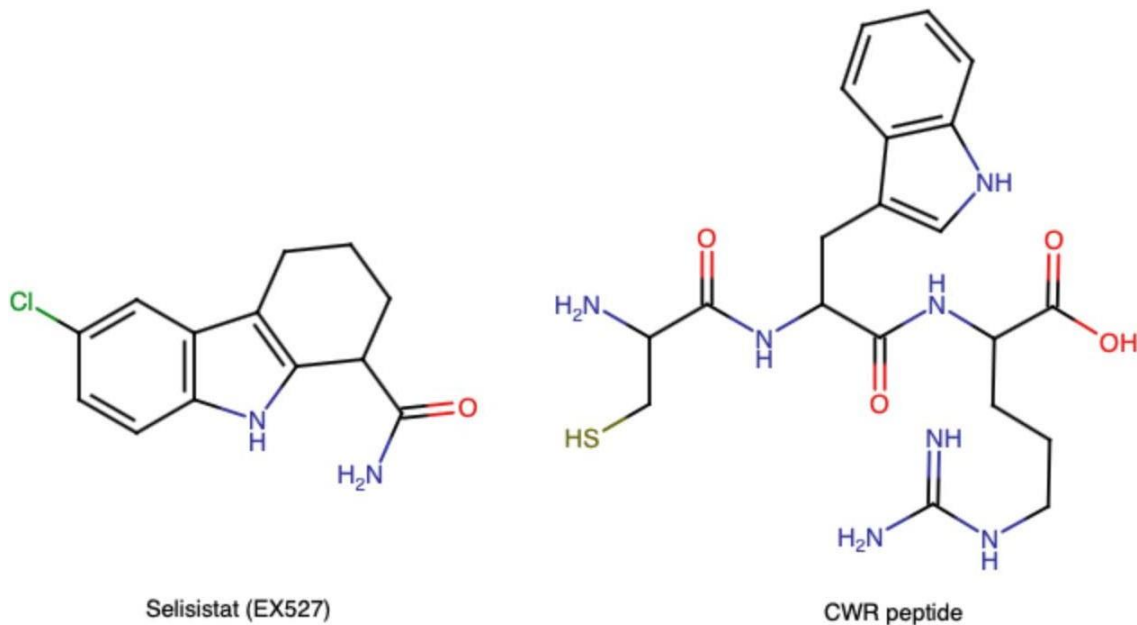


Рис. 1.2. Структури EX527 та CWR пептиду

досліджень має селісістат, який використовується при визначенні біологічної активності як референсна сполука. В результаті аналізу результатів

молекулярного докінгу 8000 трипептидів[23] та алостеричного сайту зв'язування SIRT1 було визначено десять найбільш афінних до мішені молекул, за однобуквенною номенклатурою це трипептиди CWR, QYR, NYR, HEY, HVR, NWR, FWR, NLR, HPR, HYR. В якості критеріїв оцінки використовувався docking score, кількість утворених водневих зв'язків та гідрофобних взаємодій. З числа визначених кандидатів трипептид CWR продемонстрував найвищі показники за всіма параметрами. Трипептид утворює шість водневих зв'язків із залишками Glu-214, Asn-226, Glu-230, Asp-298, Glu-300 і Gly-415 і має шість ділянок гідрофобних взаємодій із Leu-206, Thr-209, Pro-212, Phe-414, Leu-215, Arg-446, що свідчить про його високу спорідненість з алостеричним сайтом SIRT1. Тестування *in vitro* показало, що синтезований методом твердофазного пептидного синтезу CWR був здатен значно підвищувати деацетилазну активність SIRT1.

S.no.	LIGAND	Glide score	Glide E-model	Glide energy	X-score	Hydrogen bonds
1	CWR	-8.63	-71.15	-43.08	-8.71	Glu-214,Asn-226,Glu-230,Asp-298,Glu-300,Gly-415
2	QYR	-7.13	-58.67	-52.14	-7.84	Thr-209 (3), Glu-416, Asn-417, Arg-446
3	NYR	-7.00	-59.79	-46.08	-7.72	Thr-209, Asn-226 (2), Glu-230, Glu-300
4	HEY	-6.99	-59.58	-46.51	-7.96	Asn-226, Gly-415, Arg-446 (2)
5	HVR	-6.90	-56.14	-46.99	-7.62	Glu-230, Phe-413, Gly-415, Glu-416
6	NWR	-6.84	-57.51	-45.79	-7.66	His-363, Val-412, Glu-416
7	FWR	-6.74	-60.20	-45.07	-7.71	Gly-415, Glu-230
8	NLR	-6.68	-57.26	-40.74	-7.34	Arg-446(2)
9	HPR	-6.59	-58.52	-45.84	-7.22	Asn-226, Glu-230
10	HYR	-6.30	-54.61	-48.78	-7.31	Thr-209, Glu-230

Рис. 1.3. Результати молекулярного докінгу трипептидів[23]

Селісістат (EX-527) є селективним інгібітором SIRT1, який інгібує рекомбінантний людський SIRT1 з показником IC₅₀ 98 нМ. Афінність цієї сполуки до SIRT1 перевищує таку до SIRT2 та SIRT3 більше ніж у 200 разів. Інгібування деацетилювання відомих субстратів SIRT1 при дії даної сполуки спостерігалось в *in vivo* та *in vitro* експериментах. Сполука проявляє цито- та

нейропротекторну активність у випадку токсичності, індукованої мутантним НТТ у клітинних моделях хвороби Гантінгтона, що збільшує виживання, покращує психомоторну поведінку та покращує гістопатологічні показники в найбільш широко використовуваних моделях хвороби Гантінгтона на тваринах.

За результатами клінічних випробувань, не було жодних тенденцій з точки зору клінічних лабораторних оцінок, пов'язаних з дозою або лікуванням, включаючи тести функції печінки, гематологічні параметри, життєво важливі ознаки або функцію серця. Серйозних побічних явищ або побічних явищ, які призвели до припинення лікування, не спостерігалось[24].

Окрім того, в якості потенційних лігандів сіртуїнів розглядаються фрагменти хімічно модифікованого за ϵ -аміногрупою лізину-9 НЗ гістону. Переважно такі модифікації структурно нагадували амідний зв'язок у НЗК9ас.

Розділ 2

Об'єкт, методи та матеріали дослідження

2.1. Об'єкт дослідження

Об'єктом даного дослідження виступав білок SIRT1. Необхідні кристалографічні структури даного білку та його комплексів з лігандами були отримані з Protein Data Bank.

За допомогою розширених інструментів Python 3 було створено мапу Рамачандрана з метою валідації виділеної структури ліганд-білкового комплексу.

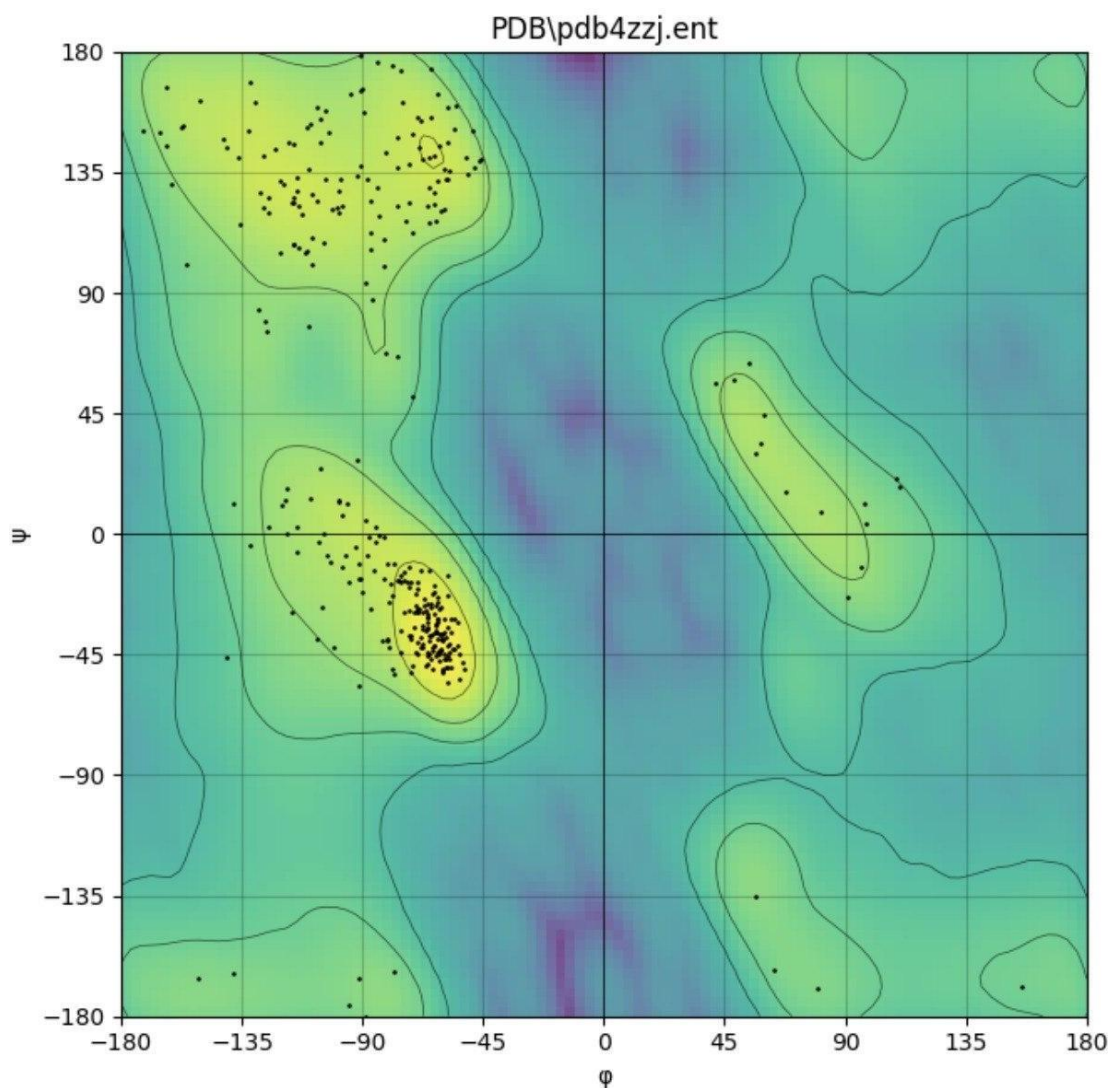


Рис. 2.1. Мапа Рамачандрана для ліганд-білкового комплексу активатора та SIRT1

2.2. Методи дослідження

В якості основних аналітичних методів дослідження було використано метод вискоефективної рідинної хроматографії, спряженої з мас-спектроскопією, та метод ядерного - зокрема, протонного - магнітного резонансу. Для тестування отриманих лігандів на предмет наявності в них афінності до сіртуїнів було використано методику SIRT-Glo.

2.2.1. Вискоефективна рідинна хроматографія, спряжена з мас-спектроскопією

В якості основного методу аналізу чистоти та природи отриманих в результаті роботи пептидних субстратів та проміжних сполук на шляху до їх отримання було використано метод вискоефективної рідинної хроматографії, спряженої з мас-спектроскопією.

Матрицею нерухомої фази даного методу виступав силікагель C18, склад рухомої фази в процесі хроматографії варіював: початковий склад - 90.95% води, 8.95% ацетонітрилу та 0.01% трифлуороцтової кислоти в якості модифікатора хроматографії; фінальний склад рухомої фази - 8.95% води, 90.95% ацетонітрилу та 0.01% трифлуороцтової кислоти в якості модифікатора хроматографії.

Для запису хроматограми використовувались УФ-детектори з довжиною хвилі 215 нм та 265 нм.

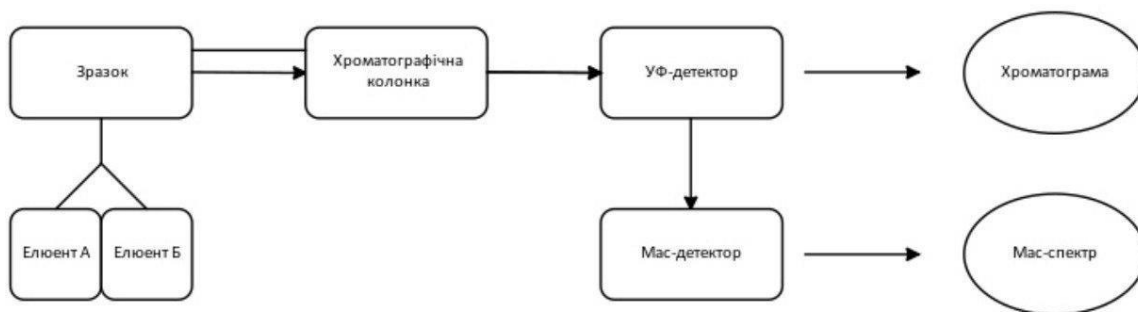


Рис. 2.2. Спрощена блок-схема хроматографу

Запропонований метод дозволяє розділити зразки, що містять більше, ніж одну речовину, та охарактеризувати їх з точки зору фрагментації в камері мас-детектору та хроматографічних параметрів. Даний аналітичний метод в роботі було застосовано як до високомолекулярних сполук пептидної природи, так і до низькомолекулярних лігандів.

2.2.2. SIRT-Glo метод

Для тестування синтезованих лігандів було використано описаний в літературі метод за назвою SIRT-Glo. Це адаптація загального методу визначення активності гістондеацетилаз для сіртуїнів.

Опосередковане ферментом деацетилювання залишку лізину полегшує сприйнятливості люміногенного субстрату до специфічного протеолітичного розщеплення ферментом у реагенті-проявителі. Продукт цього розщеплення може діяти як субстрат для люциферази, і кількість світла, що утворюється в цій реакції, пропорційна активності SIRT.

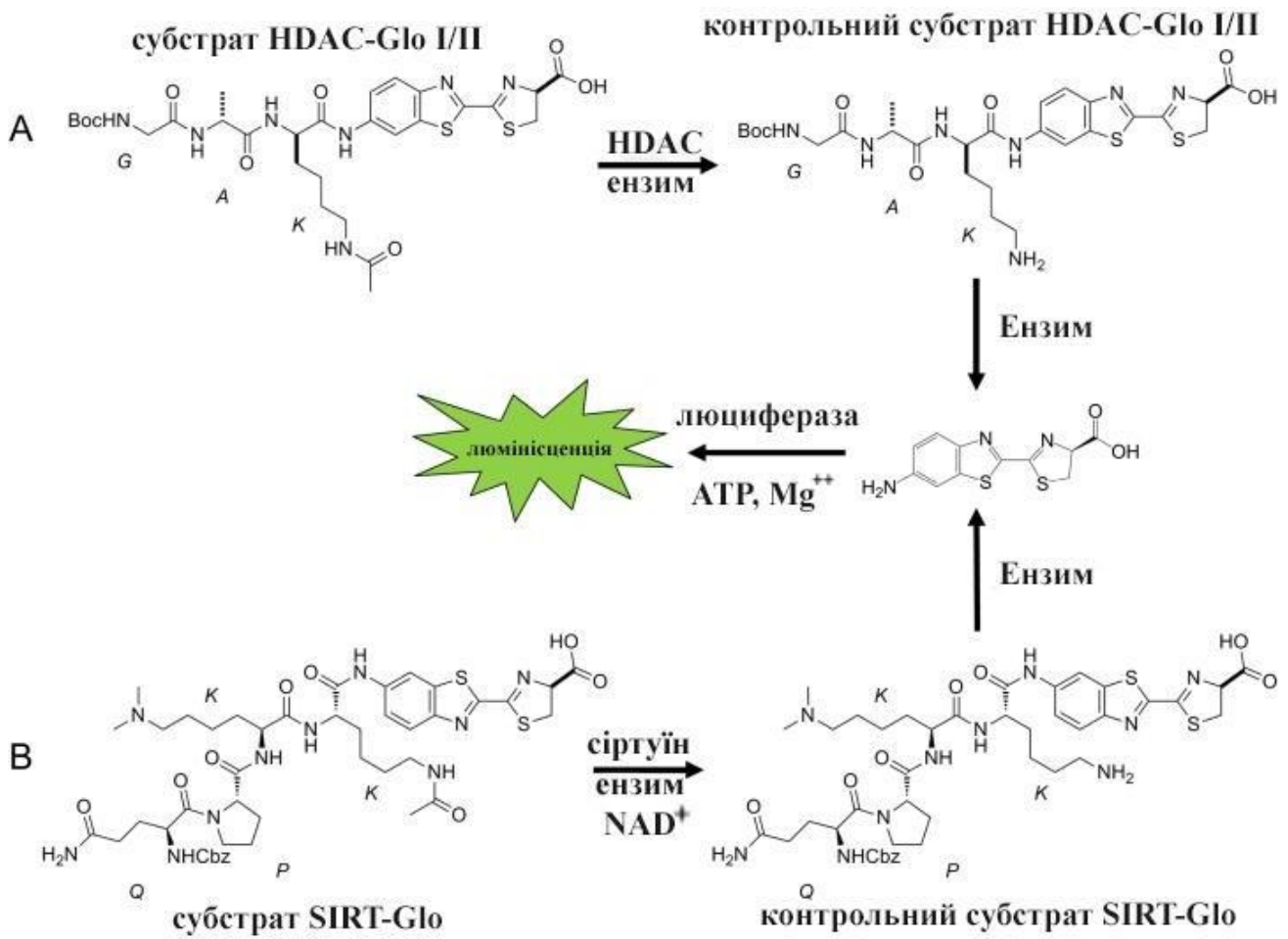


Рис. 2.3. Схематичне зображення основного принципу роботи методу SIRT-Glo[25]

Розділ 3

Результати та їх обговорення

3.1. Аналітичні результати

Після синтезу описаних вище сполук пептидної природи та селісістату наважки кожного препарату було проаналізовано за методом ВЕРХ-МС. Аналізи мас-спектру узгоджувалися з літературними даними та прогнозами. Чистота зразків згідно до цього методу становила щонайменше 98%.

3.2. Результати скрінінгу модифікованих НЗК9

В результаті проведеної роботи було синтезовано лінію пептидів, що структурно являють собою фрагмент НЗ, модифікований за залишком лізину-9. Усі модифікації, що було застосовано до ϵ -аміногрупи залишку лізину, структурно імітували ацетильну групу природнього НЗК9.

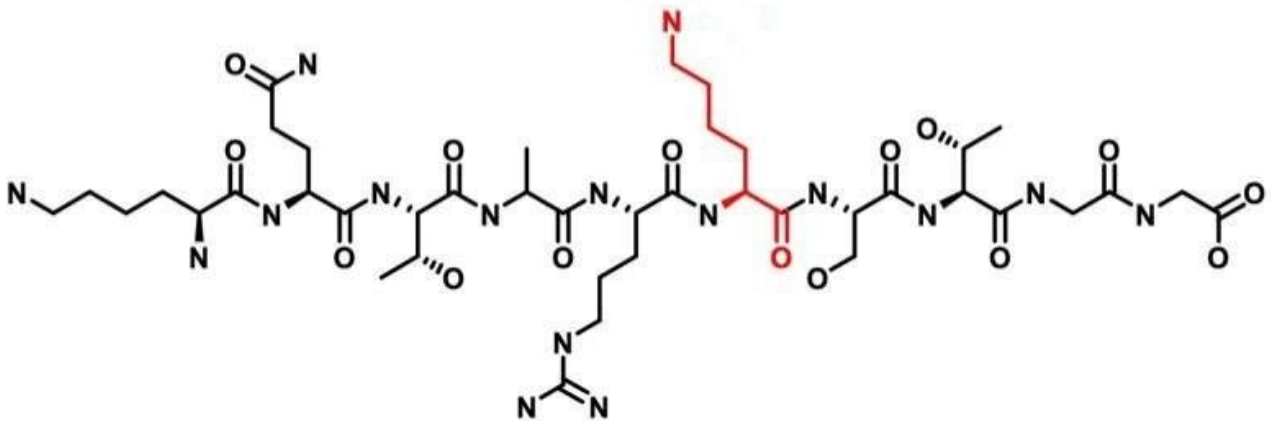


Рис. 3.1. Фрагмент НЗ, обраний для дослідження. Залишок лізину виділено червоним.

Серія протестованих на предмет зв'язування з SIRT1 лігандів показала різну активність за різних концентрацій: від незначної за великих концентрацій до майже повного зв'язування сайту зв'язування з білком.

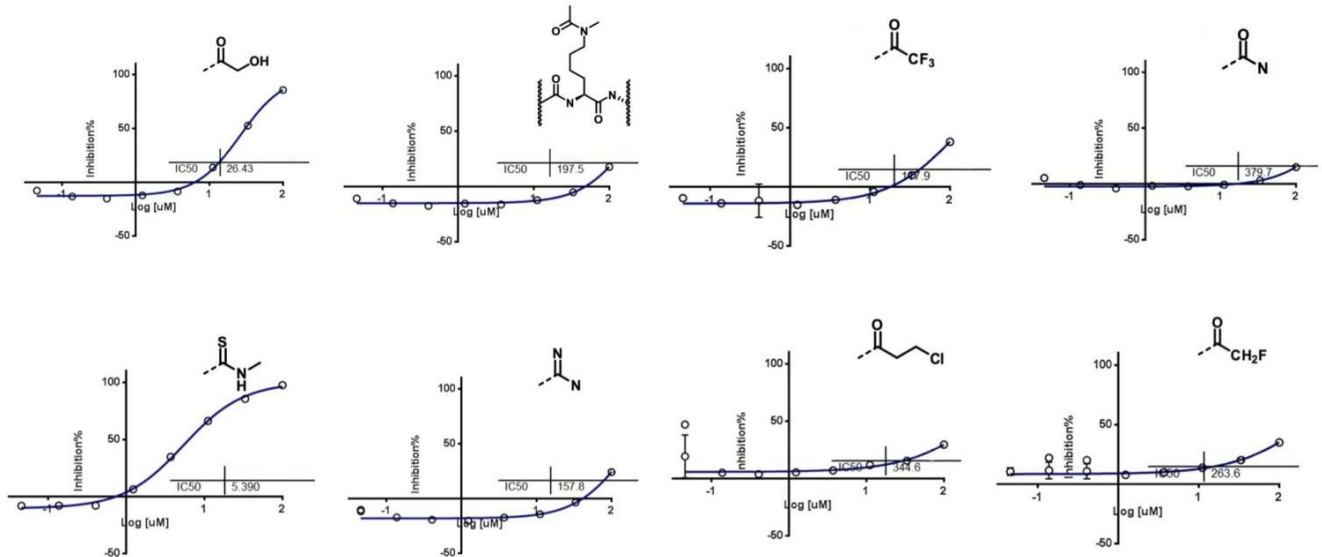


Рис 3.2. Отримані в результаті тестування за методом SIRT-Glo результати

Слід зазначити, що N-метилування ацетильованого залишку лізину суттєво зменшило його активність. Це може бути пов'язано з виключенням із взаємодій між субстратом та білком амідного атому Гідрогену, який може приймати участь в утворенні водневих зв'язків. Варто відзначити, що наявність донорів та акцепторів водневого зв'язку у фрагменті, що піддавався модифікації (включно з вищезазначеним атомом Гідрогену), частково корелювала з активністю даних сполук.

3.3. Метод синтезу селісістату (EX527)

З метою отримання селісістату з наявних вихідних сполук було запропоновано наступну схему синтезу:

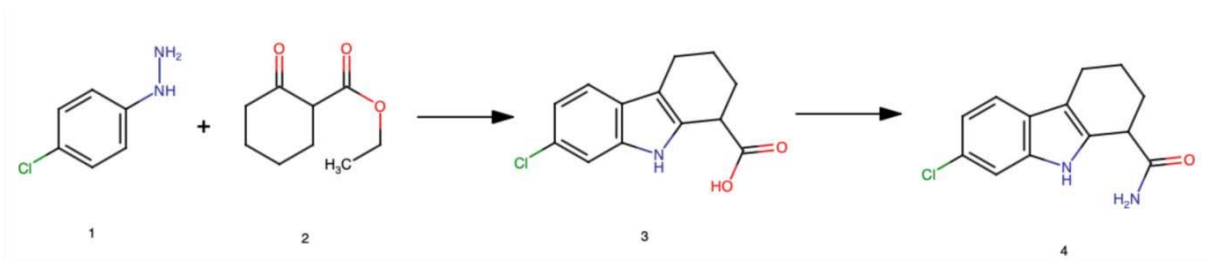


Рис. 2.4. Схема синтезу EX527

Процедура отримання сполуки 3:

сполуки 1 (1.00 еквівалентів) та 2 (1.00 еквівалентів) були розчинені в крижаній оцтовій кислоті (20 мл/г сполуки 1) та нагріті до 60 градусів Цельсію при перемішуванні. Нагрівання підтримувалось протягом 6 годин. Отримана реакційна маса була упарена, залишок розчинений в етилацетаті, промитий концентрованим розчином NaHCO_3 , просушений за допомогою Na_2SO_4 , сфільтрований та упарений.

Процедура отримання сполуки 4:

До розчину отриманої за описаним вище методом сполуки 3 (1.00 еквівалентів) в дихлорметані (10 мл/г) було при перемішуванні послідовно додано EDC (1.1 еквівалентів), NH_4Cl (1.1 еквівалентів) та триетиламін (1.1 еквівалентів). Після 16 годин перемішування реакційну масу було двічі промито водою, концентрованим розчином NaCl , просушено за допомогою Na_2SO_4 , сфільтровано та упарено. Подальша очистка сполуки здійснювалася за допомогою препаративної колоночної хроматографії, в якості елюентів було використано гексан та етилацетат.

Висновки

1. Запропоновано альтернативний шлях синтезу відомого ліганду SIRT1 селісістату.
2. Синтезовано, очищено та за допомогою скринінгу перевірено на предмет здатності інгібувати SIRT1 серію лігандів пептидної природи, що імітують фрагмент білку H3, модифікований за амінокислотним залишком лізину-9. Серед них було знайдено кілька лігандів, що можуть бути основою для їхньої подальшої оптимізації методом SAR2. На основі отриманих даних за допомогою SAR та молекулярного докінгу запропоновано нові структури потенційних лігандів сіртуїнів.
3. На основі отриманих даних та з використанням застосованих у роботі методів розроблено алгоритм подальших досліджень з розробки орто- і алостеричних лігандів білку SIRT1.

Список використаних джерел

1. Verdone, L., Agricola, E., Caserta, M., & Di Mauro, E. (2006). Histone acetylation in gene regulation. *Briefings in Functional Genomics*, 5(3), 209-221.
2. Das, P. M., & Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *Journal of clinical oncology*, 22(22), 4632-4642.
3. Verdone, L., Wu, J., van Riper, K., Kacherovsky, N., Vogelauer, M., Young, E. T., ... & Caserta, M. (2002). Hyperacetylation of chromatin at the ADH2 promoter allows Adr1 to bind in repressed conditions. *The EMBO journal*, 21(5), 1101-1111.
4. Brachmann, C. B., Sherman, J. M., Devine, S. E., Cameron, E. E., Pillus, L., & Boeke, J. D. (1995). The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes & development*, 9(23), 2888-2902.
5. Frye, R. A. (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 260(1), 273-279.
6. Min, J., Landry, J., Sternglanz, R., & Xu, R. M. (2001). Crystal structure of a SIR2 homolog–NAD complex. *Cell*, 105(2), 269-279.
7. Finnin, M. S., Donigian, J. R., & Pavletich, N. P. (2001). Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nature structural biology*, 8(7), 621-625.
8. Schuetz, A., Min, J., Antoshenko, T., Wang, C. L., Allali-Hassani, A., Dong, A., ... & Plotnikov, A. N. (2007). Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure*, 15(3), 377-389.
9. Sanders, B. D., Jackson, B., & Marmorstein, R. (2010). Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(8), 1604-1616.
10. Nemoto, S., Fergusson, M. M., & Finkel, T. (2005). SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 α . *Journal of Biological Chemistry*, 280(16), 16456-16460.
11. Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature*, 434(7029), 113-118.
12. Moynihan, K. A., Grimm, A. A., Plueger, M. M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Méneur, C., ... & Imai, S. I. (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic β cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell metabolism*, 2(2), 105-117.

13. Bordone, L., Motta, M. C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U. S., Apfeld, J., ... & Guarente, L. (2015). Correction: Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells. *PLoS Biology*, *13*(12), e1002346.
14. Denu, J. M. (2003). Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. *Trends in biochemical sciences*, *28*(1), 41-48.
15. Banks, A. S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutiérrez-Juárez, R., Rossetti, L., ... & Accili, D. (2008). SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell metabolism*, *8*(4), 333-341.
16. Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., ... & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056-1060.
17. Li, X., Zhang, S., Blander, G., Jeanette, G. T., Krieger, M., & Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular cell*, *28*(1), 91-106.
18. Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., ... & Carruba, M. O. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science*, *310*(5746), 314-317.
19. Oberdoerffer, P., Michan, S., McVay, M., Mostoslavsky, R., Vann, J., Park, S. K., ... & Sinclair, D. A. (2008). SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*, *135*(5), 907-918.
20. Kim, D. et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* *26*, 3169–3179 (2007)
21. Kiviranta, P. H., Suuronen, T., Wallén, E. A., Leppanen, J., Tervonen, J., Kyrylenko, S., ... & Jarho, E. M. (2009). N ϵ -thioacetyl-lysine-containing tri-, tetra-, and pentapeptides as SIRT1 and SIRT2 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, *52*(7), 2153-2156.
22. Pacholec, M., Bleasdale, J. E., Chrunyk, B., Cunningham, D., Flynn, D., Garofalo, R. S., ... & Ahn, K. (2010). SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(11), 8340-8351.
23. Kumar, R., Nigam, L., Singh, A. P., Singh, K., Subbarao, N., & Dey, S. (2017). Design, synthesis of allosteric peptide activator for human SIRT1 and its biological evaluation in cellular model of Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, *127*, 909-916.

24. Süssmuth, S. D., Haider, S., Landwehrmeyer, G. B., Farmer, R., Frost, C., Tripepi, G., ... & Paddington Consortium. (2015). An exploratory double-blind, randomized clinical trial with selisistat, a SirT1 inhibitor, in patients with Huntington's disease. *British journal of clinical pharmacology*, 79(3), 465-476.
25. Halley, F., Reinshagen, J., Ellinger, B., Wolf, M., Niles, A. L., Evans, N. J., ... & Gul, S. (2011). A bioluminogenic HDAC activity assay: validation and screening. *Journal of biomolecular screening*, 16(10), 1227-1235.