

## МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ЗА УЧАСТЮ SH2-ДОМЕНІВ

В. В. ГУРМАЧ, О. М. БАЛИНСЬКИЙ, М. О. ПЛАТОНОВ,  
П. О. БОРИСКО, Ю. І. ПРИЛУЦЬКИЙ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

*E-mail: prylut@ukr.net*

Отримано 11.11.2011

Створення новітніх фармацевтичних препаратів для лікування хвороб, пов'язаних з порушеннями функціонування протеїнових комплексів, є важливою медико-соціальною проблемою, яка потребує комплексного підходу до її вирішення, зокрема врахування останніх досягнень в галузі комп'ютерного моделювання біологічних процесів.

В роботі узагальнено дані літератури щодо структури, функціонування, класифікації, молекулярних порушень доменів SH2 (Src Homology), а також запропоновано власну методику молекулярного докінгу, як одного з найперспективніших методів фармакологічних досліджень. Показано, що найбільший інтерес з погляду практичного застосування для отримання нових патентоспроможних інгібіторів протеїн-протеїнових взаємодій методом молекулярного докінгу становлять саме SH2-домени, оскільки вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів, виступаючи як посередники цих специфічних взаємодій.

**Ключові слова:** протеїнові комплекси, SH2-домени, молекулярний докінг.

Біологічні процеси у живих системах відбуваються за участю великого різноманіття протеїнових молекул, які функціонують завдяки взаємодії одна з одною у складі стабільних або динамічних протеїнових комплексів. Кількість і різноманітність протеїнових взаємодій настільки велика, що графічне подання їх має вигляд надзвичайно складної і заплутаної мережі [1–7]. А відтак знання просторової структури комплексів клітинних протеїнів та їхніх лігандів є важливим кроком на шляху до розуміння механізмів їх функціонування.

У наш час методи комп'ютерного моделювання слугують невід'ємною частиною фундаментальних досліджень, метою яких, зокрема в біології, є з'ясування молекулярних механізмів функціонування протеїнів. Метод молекулярного моделювання, який дає змогу віднаходити комплекси ліганду та протеїну-мішені, називається молекулярним докінгом (МД). Саме за його допомогою створюють бібліотеки інгібіторів протеїн-протеїнових взаємодій на прикладі SH2-, SH3-, PDZ-, бромо-, хромо-доменів і т. д [8].

Найменш дослідженими серед них є SH2-домени. Вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній сигналізації, відіграють важливу роль в онтогенезі як посе-

редники специфічних протеїн-протеїнових взаємодій. Наприклад, шляхом блокування SH2-доменів пригнічується прогресування злоякісних пухлин, модулюється передача сигналів на клітинному та органному рівнях.

Метою цієї роботи є узагальнення даних літератури щодо комп'ютерних методів вивчення поведінки SH2-доменів, як важливого фактора внутрішньоклітинного функціонування, та взаємодії їх із речовинами, які модулюють активність і характеристики цих молекулярних комплексів, для створення унікального алгоритму дослідження SH2-доменів з використанням МД, що уможливило його подальше застосування для передбачення можливих внутрішньоклітинних порушень, пов'язаних з дією SH2-доменів, та їх терапевтичного усунення.

### Молекулярний докінг

Зв'язки між протеїнами, нуклеїновими кислотами, вуглеводами та ліпідами відіграють головну роль у передачі сигналів. Окрім того, взаємна орієнтація двох взаємодіючих структур впливає на тип і силу сигналу. За допомогою комп'ютерного моделювання міжмолекулярних взаємодій вдається отримати

оптимальні просторові структурні комплекси ліганду та протеїну-мішені [9]. Їх детальний аналіз дає змогу визначити основні сили, що сприяють зв'язуванню найбільш комплементарних один до одного частин молекул. Як наслідок, існує можливість цілеспрямовано впливати на характеристики такого зв'язування модифікацією однієї або декількох взаємодіючих молекул. Головним результатом МД-розрахунку є визначення оптимальної взаємної просторової орієнтації ліганду/протеїну та протеїну-мішені [10] (рис. 1).

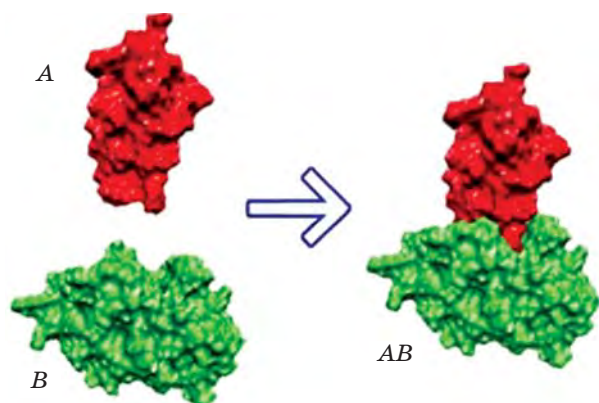


Рис. 1. Схематичне зображення взаємодії протеїнів A і B

МД проводять для прогнозування міцності зв'язування тих чи інших молекулярних комплексів і типу вихідного сигналу, орієнтації малих молекул (можливо, певного фармацевтичного препарату) під час взаємодії з протеїном-мішенню, щоб отримати необхідну інформацію про силу зв'язування та їхню функціональну активність. Отже, цей метод є перспективним для розроблення лікарських препаратів [11]. Виходячи з цього значні зусилля наразі спрямовані на вдосконалення чисельних методів МД з метою передбачення міжмолекулярних взаємодій. Розглянемо два основних методи МД, які зарекомендували себе якнайкраще, — гнучкий докінг та жорсткий докінг.

Метод жорсткого докінгу не враховує конформаційну рухливість як для протеїну, так і для ліганду. У цьому разі завдання докінгу зводиться до пошуку оптимальної орієнтації ліганду (в конкретній конформації) у сайті зв'язування протеїну [12]. З погляду обчислення цей метод є простим [13–15], однак дослідження конформаційно-рухливих лігандів за ним провести складно. Зазвичай жорсткий докінг використовують для оцінювання енергії конкретного молекулярного комплексу [16–18].

Гнучкий докінг враховує конформаційну рухливість ліганду. По суті, він зводиться до автоматичного перебирання конформацій та орієнтацій ліганду в сайті зв'язування і оцінювання енергії міжмолекулярних взаємодій. Рухи включають трансформацію жорсткого тіла ліганду, повороти, зміну його внутрішньої структури і торсійного кута. Кожен рух у конформаційному просторі ліганду зумовлює зміну енергії в системі й після кожного такого руху потрібно ще раз обчислювати її загальну енергію. Головною перевагою цього методу є те, що він моделює процеси, наближені до реальності, тобто ті, які відбуваються за міжмолекулярних взаємодій. Недоліком його є те, що він потребує тривалого часу для розрахунків.

Використання МД є неможливим без застосування так званих скоринг-функцій, за допомогою яких описують міцність зв'язування між двома молекулами. Найчастіше одна з молекул — це невелика органічна сполука, а друга — її біологічна мішень (рецептор, протеїн) [19]. Також скоринг-функції потрібні для вивчення взаємодії між двома різними макромолекулярними структурами, наприклад між двома протеїнами [20] або між протеїном і лігандом, ДНК [21].

Існує три основних класи скоринг-функцій:

1) силове поле: сила зв'язування визначається сумою міжмолекулярних ван-дер-ваальсових та електростатичних взаємодій між усіма атомами двох міжмолекулярних комплексів;

2) емпіричний: базується на підрахунку числа різних типів взаємодій між двома досліджуваними молекулами [22], зокрема кількості атомів ліганду і рецептора, що контактують між собою, або комплексу доступної для розчинника поверхні порівняно з вільним лігандом і протеїном;

3) заснований на знанні/передбаченні: ґрунтується на статистичних спостереженнях міжмолекулярних контактів між 3D-структурами. Структури зазвичай беруть з 3D баз даних (наприклад, Кембриджська структурна база даних). Припускають, що близькі міжмолекулярні взаємодії між різними атомами або функціональними групами виникають випадково частіше, ніж цього очікують. Як наслідок, вони роблять значний внесок у міжмолекулярне зв'язування.

Незважаючи на існування різноманітних варіантів МД, у кожному окремому випадку алгоритм проведення докінгу буде унікальним і залежатиме від структурних та функціональних особливостей досліджуваних

об'єктів. У класичному варіанті МД завдання алгоритму конформаційного пошуку зводиться до перебирання комплексів, утворених унаслідок варіацій торсійних кутів ліганду та його руху, як цілої частини, відносно нерухомої структури протеїну-мішені.

Сучасні алгоритми МД можна звести до такої простої схеми, як «ключ-замок», де потрібно знайти правильну орієнтацію ключа, який відкриває замок. Ту частина протеїну, з якою взаємодіє ліганд, розглядають як замок, а сам ліганд — як ключ. Але для проведення якісного МД потрібно врахувати рухливість як ліганду, так і протеїну, причому діапазон рухливості може бути різним — від невеликих рухів бічних частин до масштабних доменних рухів [23]. Якщо розглядати структуру протеїну в комплексі з лігандом близького хемотипу, то результат МД буде точнішим, ніж якщо брати інший скефолд ліганду або взагалі використовувати апоформу. Це неможливо зробити в рамках схеми «ключ-замок», однак вдається за допомогою схеми «рука в рукавичці» [24].

На перший погляд логічним розв'язанням цієї проблеми є врахування рухливості протеїну в комп'ютерній програмі, за допомогою якої проводять МД. Наявні обчислювальні засоби не дозволяють проводити таке моделювання за прийнятний час для великих баз даних, оскільки молекула протеїну дуже велика і врахування її рухливості за всіма ступенями вільності може призвести до так званого комбінаторного вибуху (астрономічного збільшення числа можливих варіантів). Лише у деяких програмах передбачена обмежена рухливість сайтів зв'язування протеїну (як правило, на рівні невеликої адаптації конформацій бічних частин залишків активного центру). Інший підхід полягає в МД декількох різних конформацій одного й того ж самого протеїну з наступним відбиранням найоптимальніших варіантів з кожного запуску МД. Ще один спосіб полягає в тому, щоб знайти універсальну структуру протеїну-мішені, за участю якої МД давав би задовільні результати для різних класів лігандів, зменшуючи при цьому кількість пропущених, але правильних розв'язків.

Отже, найбільш перспективні, але при цьому й найбільш складні, методи МД враховують конформаційну рухливість не лише ліганду, але й рецептора. На сьогодні існує низка розрахункових програмних пакетів, у яких реалізовано ці можливості. Найпростішим чисельним методом серед них є гнучкий докінг, який дає змогу врахувати конформаційну рухливість бічних ланцюгів

амінокислотних послідовностей, розміщених безпосередньо в сайті зв'язування. У більшості випадків сучасні алгоритми конформаційного пошуку за короткий час знаходять потрібні конформації, близькі до експериментальних. Як приклад, таке моделювання можна провести за участю SH2-доменів, оскільки вони є складовою частиною майже усіх класів протеїнів і на цей час є недостатньо вивченими.

## SH2-домени

SH2 — компактний глобулярний домен, який взаємодіє з протеїнами, що містять фосфорильований залишок тирозину (Tyr). Здебільшого він міститься в онкопротеїнах (Src oncoprotein) та в протеїнах, які входять до сигнальних каскадів клітини. Бере участь у знаходженні інших протеїнів, розпізнаванні фосфотирозину на їхній поверхні.

Геном людини кодує близько 120 SH2-доменів, які входять до 110 протеїнів і беруть активну участь у протеїн-протеїнових взаємодіях. Вони присутні у найрізноманітніших класах протеїнів, включаючи протеїнкінази (Src, Lck), фосфатази (SHP2, SHIP2), фосфоліпази (PLC $\gamma$ 1), фактори транскрипції (STAT), регуляторні протеїни (SOCS), адаптери протеїнів (Grb2), структурні протеїни (SHC) та ін. Широка розповсюдженість SH2-доменів в організмі тварин і майже повна відсутність їх у мікроорганізмах (наприклад, примітивний SH2-фрагмент у дріжджах) дозволяє зробити припущення, що їхня поява пов'язана з ускладненням механізмів передачі сигналів у багатоклітинних організмах [25].

Саме протеїн-протеїнові взаємодії відіграють важливу роль у клітинному рості та розвитку. Вони реалізуються шляхом розпізнавання коротких специфічних амінокислотних послідовностей [26]. Пептидні послідовності є індивідуальними для кожного протеїну і SH2-домен, у свою чергу, відіграє роль посередника, тобто частини, де відбувається зв'язування.

Що стосується структури SH2-домену, то він складається з двох  $\alpha$ -спіралей та семи  $\beta$ -структур (рис. 2). SH2-домени мають високу спорідненість до фосфотирозину. Вони є найбільшим класом pTyr — розпізнавальних доменів [27, 28].

Функціонально SH2-домени, як правило, зв'язані з тирозинкіназами протеїнів (РТК). Вони беруть активну участь у внутрішньоклітинній передачі сигналів, що пов'язано з їхньою здатністю специфічно

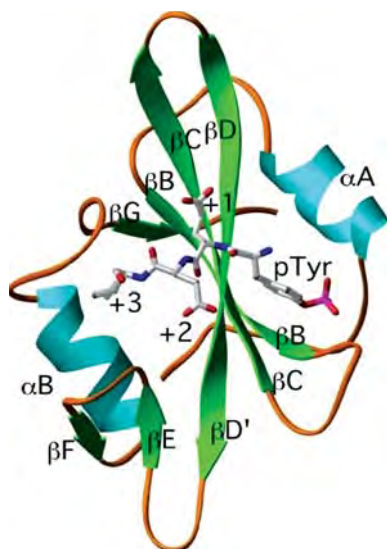


Рис. 2. SH2-домен, зв'язаний із фосфотирозином

розпізнавати фосфотирозин. Завдяки цьому можна визначити локалізацію конкретних сайтів фосфотирозину. Цей процес має фундаментальне значення при передачі сигналів через мембрану: коли сигнал надходить у позаклітинний простір, він контролюється за допомогою рецепторів; потрапивши знов у клітину — контролюється структурами, які здатні розпізнати фосфотирозин. Фосфорилування тирозину призводить до активації протеїн-протеїнових взаємодій, унаслідок чого SH2-вмісні протеїни зв'язуються із фосфотирозиновим сайтом. Оскільки цей процес є досить чутливим до будь-яких змін, він може стати причиною мутацій SH2-доменів або їхніх фрагментів (табл. 1). Здебільшого це стосується 142–169 амінокислотних залишків. Такі мутації порушують специфічні взаємодії SH2-доменів з партнерами і можуть спричинювати збої у клітинній сигналізації, впливати на зв'язування Src із субстратом, зокрема протеїнами цитоскелета і тому можуть бути причиною різноманітних захворювань людини (найчастіше це онкозахворювання; таблиця) [25].

Роботи Cantley et al. відзначено як перші систематичні дослідження специфіки протеїн-протеїнових взаємодій за участю SH2-доменів [29]. Використовуючи пептидну бібліотеку з лігандів SH2, було відібрано найбільш оптимальні структурні фрагменти для 25 SH2-доменів, які поділили на 5 груп залежно від наявності в них  $\beta D5$ -складки. Подальші дослідження виявили, що SH2-домени впізнають певні специфічні залишки С-кінця фосфотирозину (pTyr) +1, +2 і +3 (тобто залишки з певною позицією після

pTyr упізнаються окремим SH2-доменом). Звідси випливає, що кожен окремий SH2-домен зв'язується лише з конкретними фосфотирозинвмісним фрагментом (рис. 3). Наприклад, Src SH2 переважно впізнають Glu-Glu-Ile (зв'язувальний фрагмент позначається як pYEEI), тимчасом як Grb2 SH2-домен зв'язується з іншим фрагментом pYVNV. Однак повне розуміння цього ефекту потребує детального вивчення термодинамічних особливостей взаємодії фосфопептидів із SH2-доменами.

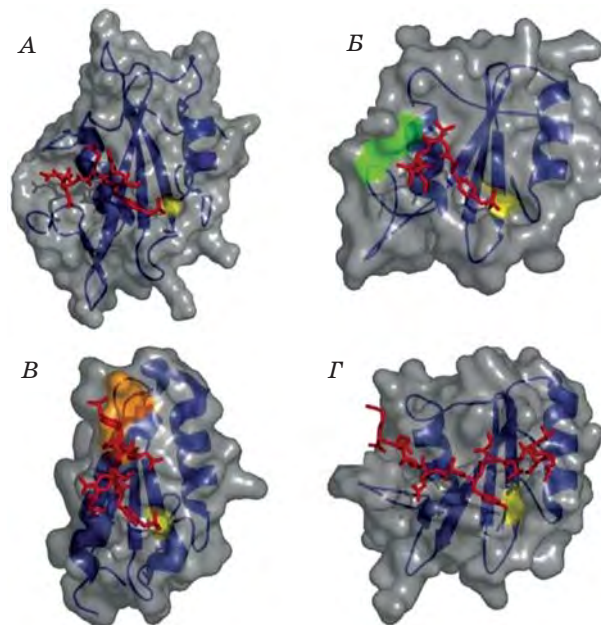


Рис. 3. Варіанти зв'язування SH2-доменів (стрічкова та поверхнева діаграми) [25]:

А — структура SH2-домену, зв'язаного з pTyr-Glu-Glu-Ile-пептидом (PDB, 1SPS). Поверхню SH2-домену показано як напівпрозору частину, а вторинні структурні елементи — голубим кольором;  $\alpha A$  — спіраль справа,  $\alpha B$  — спіраль зліва; Arg  $\beta B5$ , залишок для зв'язування pTyr, показано жовтим кольором; N-кінець pTyr-пептиду (червоний колір) займає pTyr-зв'язувальну кишеню. Пептид рухається повз центральну  $\beta$ -частину SH2-домену; +1 і +2 глутамати зв'язуються з поверхнею домену, а бічна частина +3 (зліва) входить у гідрофобну кишеню.

Б — Grb2 SH2 в комплексі з pYVNV (червоний колір), (PBD, 1BMB) і Trp (зелений колір) стабілізують конформацію  $\beta$ -структури, критично необхідну для високоафінного зв'язування.

В — дві фосфотирозинзв'язувальні кишені подано в одному SH2-домені APS. Одна APS SH2 молекула зв'язана з pYETDpY (червоний колір) пептидом активаційної петлі INSR; pTyr-1158 взаємодіє з Arg-438 (зелений колір), Lys-455 і Lys-457 (помаранчевий колір) створюють іншу кишеню зв'язування для pTyr-1162 (PDB, 1RQQ).

Г — SH2D1A/SAP у комплексі з нефосфорильованим SLAM пептидом KSLTIYAQVQK (червоний колір) (PBD, 1D4T)

**Захворювання людини, пов'язані з мутаціями генів SH2-доменів**

№	Назва SH2-вмісного протеїну	Короткий опис мутацій	Фенотип
1	ABL1	t(9;22) транслокація призводить до злиття з геном BCR	Хронічна лейкемія, гостра лімфобластозна лейкемія
2	ABL2	t(1;12)(q25;p13) транслокація з ETV6/TEL	Гостра мієлогенна лейкемія (Cazzaniga et al., 1999)
3	BLNK	Заміна пари основ у місці сплайсингу призводить до зменшення або повної втрати BLNK-транскриптів	Імунодефіцит людини (Minegishi et al., 1999) Попередник гострого лімфатичного лейкозу (Jumaa et al., 2003)
4	BTK	Мутації сайтів сплайсингу	Хвороба Брутона
5	CVL	Зміни в частинах MLL-гена: t(4;11)(q21;q23) t(11;14)(q23;q32) t(11;22)(q23;q12)	Гостра мієлогенна лейкемія Гостра лейкемія Лімфома В-клітин Саркома
6	CRK	Вилучення з локусу MDLS, MDS, MDCR, DEL17p13.3, C17DELp13.3 частини 17p13.3	Синдром лісенцефалії Міллера–Дікера
7	ITK	t(5;9)(q33;q22) транслокація в SYK	Синдром лісенцефалії Міллера–Дікера
8	JAK2	t(9;12)(p24;p13) зливаються з TEL Мутації лінії клітин V617F	Периферійні Т-клітинні лімфоми (Streubel et al., 2005) Гостра лімфатична лейкемія, хронічна мієлогенна лейкемія
9	JAK3	Унаслідок вставки або видалення нуклеотидів зсувається рамка зчитування або процес взагалі обривається	Справжня поліцитемія
10	LCK	Зниження експресії р56 (lck), можливо через альтернативний сплайсинг екзона 7	Імунодефіцит, лімфопенія (Russell et al., 1995) Гострий лейкоз Т-клітин (Burnett et al., 1991)
11	PTPN11	Унаслідок missense мутації амінокислота D61 замінюється на N-SH2, через що посилюється функціональна активність. Missense мутації у родині екзотів 7, 12 та 13 становлять 95% ; мутації родини екзотів та дефекти у родині 13 впливають на протеїнові фосфатази тирозинового домена, унаслідок чого посилюється функціональність	Імунодефіцит (Goldman et al., 1998) Синдром Нунана (Tartaglia et al., 2001) Прогресивна кардіоміопатія (LS) (Digilio et al., 2002) Мієломоноцитарний лейкоз (Tartaglia et al., 2003)
12	SH2D1A	Мутації, пов'язані з неправильним функціонуванням протеїну	Хвороба Брутона
13	STAT1	Унаслідок нуклеотидних замін передчасно генерується стоп-кодон	Зростає уразливість до вірусних і бактеріальних захворювань
14	STAT5B	Гомозиготні мутації A630P	Імунодефіцит

В роботі [25] автори проаналізували специфіку SH2-доменів з точки зору сайту зв'язування із фосфотирозиновим залишком. Ці результати розширюють уявлення щодо взаємодії SH2-доменів, але вони є обмеженими, оскільки розрахувати вільну енергію для SH2-доменів — надзвичайно складне завдання. Складнощі в обчисленнях також зумовлені великою кількістю електростатичних взаємодій, що виникають під час зв'язування, і значною гнучкістю лігандів. Підходи до розрахунку вільної енергії

зв'язування з використанням термодинамічної схеми відірваності ліганду від свого середовища у цьому разі є недоцільними. Навіть мала статистична похибка у розрахунку вільної енергії ліганду значно перевищує її експериментальне значення.

Для здійснення вищезазначених розрахунків використовують метод симуляції вільної енергії МД. Показано, що такі розрахунки афінності зв'язування фосфотирозинового пептиду pYEEI з Lck SH2 добре узгоджуються з експериментальними даними.

Це свідчить про те, що атомні моделі можуть достатньо точно відтворювати молекулярні взаємодії.

### Компоненти SH2-доменів людини

Після видалення повторень і спрощення варіантів псевдогенів загалом визначено 120 SH2-доменів, які містяться в 110 різних протеїнах, 10 з яких мають подвійні SH2-домени. Частина із цих 110 протеїнів людини наведена в таблиці із зазначенням місцезнаходження кожного гена в хромосомах, мутацій та хвороб, пов'язаних з ними.

Згідно з останньою класифікацією, SH2-домени поділено на 11 функціональних категорій, які базуються на модульній структурі домену (рис. 4). Функціональний вплив, наприклад, будь-якого рецептора тирозинкінази (РТК) залежить від підвідділів SH2-вмісних протеїнів (таблиця), які вона мобілізує безпосередньо або опосередковано через фосфорильовані молекули скефолда. Ці дані визначають головні шляхи впливу РТК на внутрішньоклітинні процеси. рТур-залежні взаємодії в SH2-вмісних протеїнах спрямовують сигнал РТК у визначену точку. Цей процес охоплює фосфорилування тирозину (через цитоплазматичні РТК і тирозин-фосфатазу), контроль метаболізму фосфоліпідів (фосфатидилінозитол, інозитолфосфат), регуляцію маленьких ГТФаз (включаючи Ras, Rho і Rap родини) гуанінвмісними обмінними факторами і генну експресію ГТФаз (у рамках сигнальних каскадів). Звідси випливає, що SH2-домени діють як адаптери (Grb2, Crk і Nck), кожен з яких спрямований на групу зв'язувальних протеїнів з подібними функціями. Так, Nck мобілізує цитоскелетні регулятори, зокрема нейронні протеїни N-Wasp і Pak серин/треонінові кінази [30]. Адаптерний протеїн Grb2 зв'язується із Sos-репресором і Gab1 (ген, що кодує Grb2), які беруть участь у MAPK/PI3K сигналізації та взаємодії Crk (специфічний інгібітор кіназ) з гуаніновими обмінними факторами. Крім того, значна частина SH2-доменів регулює тривалість РТК-сигналізації. Наприклад, супресори сигналізації цитокінів SOCS-протеїни, транскрипційно індуквані JAK/STAT-сигналами, блокують JAK-тирозинкіназу активність. Cbl (протеїни убіквітинлігази) індукують убіквітування рТур-залежного рецептора і, таким чином, створюють зв'язувальні місця для внутрішньоклітинних протеїнів з центрами убіквітинового зв'язування, що беруть участь у клітинному транспортуванні.

SH2-домени також можуть взаємодіяти з активними сайтами рецепторів тирозинкіназ (RTKs). Як приклад, можна навести SH2-домени APS-адаптерного протеїну, який одночасно гомодимеризується і зв'язує фосфорильовану активаційну петлю інсулінового рецептора (INSR), унаслідок чого відбувається стабілізація його активного стану [31]. SH2-домен Grb14 протеїну також зв'язує фосфорильовану активаційну петлю інсулінового рецептора, але при цьому слід врахувати, що в нього є певна послідовність (BPS-частина), розміщена між SH2- та PH-доменами, яка антагонізує рецепторну активність, виступаючи псевдосубстратом [32]. Отже, SH2-домени, окрім того що діють як on/off-регулятори внутрішньоклітинних біохімічних процесів, можуть модифікувати активність, кінетику і субстратну специфічність тирозинкіназних сигналів. Така велика кількість різноманітних зв'язків і каталітичних доменів у протеомі людини дозволяє асоціювати SH2-домен з SH3-, РТВ-, РН-, GEF, GAP-доменами, кіназами, фосфатазами (рис. 4). Запуск сигнальних каскадів SH2 доменами починається біля плазматичної мембрани і лише потім запускаються специфічні сигнальні каскади, які індукують клітинний ріст, диференціацію, морфологію і метаболізм.

Однак дослідження SH2-доменів, враховуючи їхні структурні особливості, є не лише складним завданням, але й таким, яке зазвичай не виправдовує затрачених ресурсів. Тому для спрощення розрахунків С-кінці SH2-доменів часто виключають із послідовностей при використанні певних біоінформативних чисельних методів. Незважаючи на те, що С-кінцева ділянка SH2-домену більш консервативна, ніж N-терміналь або центральні послідовності, вона все ж здатна впливати на стабільне проходження фолдингу і зв'язування з лігандом.

За допомогою методу виключення С-кінців SH2-домену з використанням бази даних Pfam та SMART було уточнено амінокислотний склад SH2-доменів. Застосовуючи комп'ютерну програму для вирівнювання послідовностей ClustalW, отримали дерево SH2-доменів (рис. 5). Кожен колір цього дерева позначає функціональний клас протеїнів, які містять певний SH2-домен.

Проаналізувавши функціональні та структурні особливості SH2-доменів, вдалося виділити невелику кількість тих, які раніше досить рідко згадувались у літературі. Наприклад, LOC284948 член родини SH2-вмісних протеїнів, який включає SLP-76, BLNK, MIST/CLNK і SH2D5 (LOC400745), має структуру домену, подібну до Shc-родини.

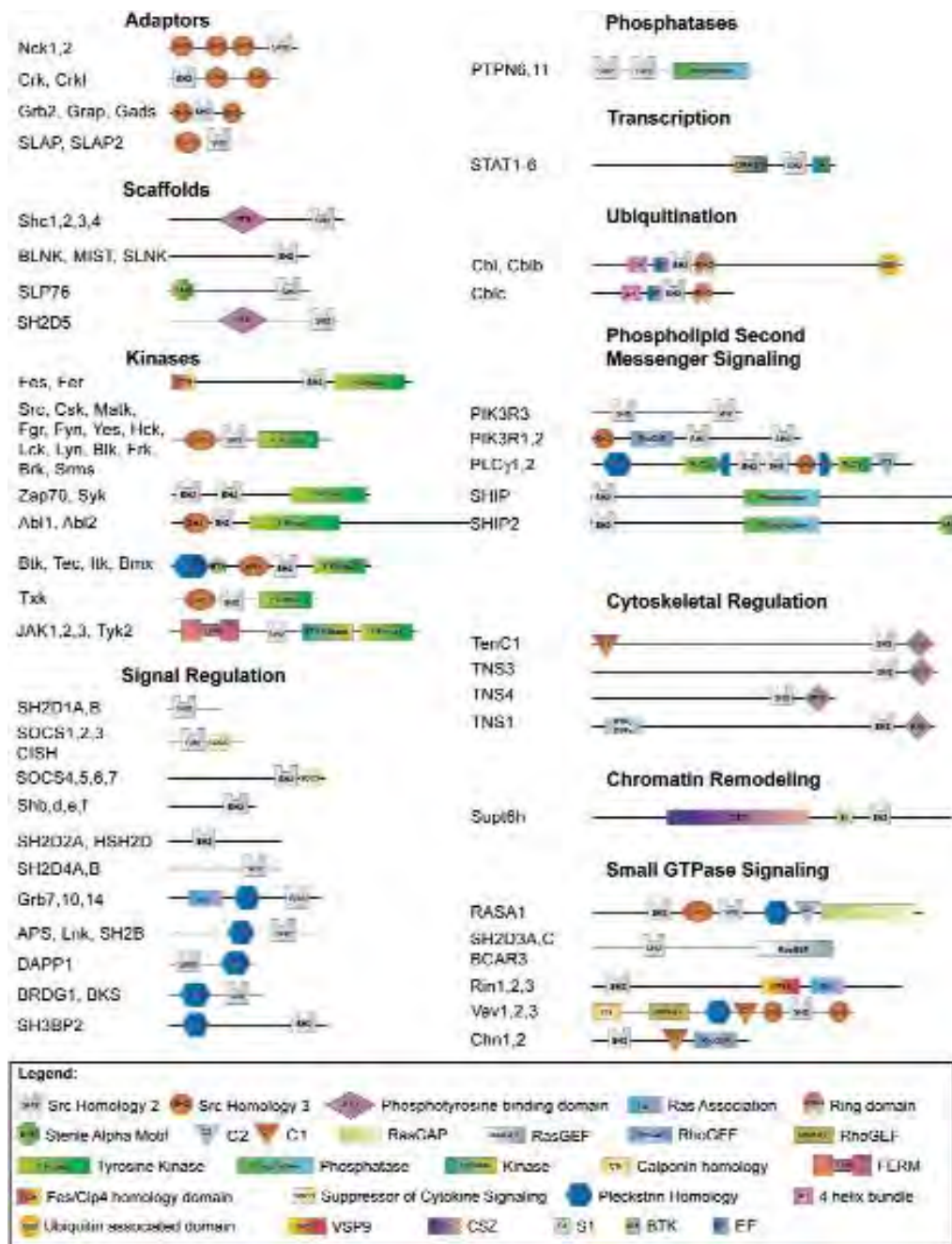


Рис. 4. Протеїни, до складу яких входять SH2-домени [25]

Кожен член родини HSH2D, який бере участь у кровотворенні, містить один SH2-домен. За відсутності інших доменів вони класифікуються, як сигналрегулювальні протеїни. Про їхні клітинні функції відомо мало. Протеїни цієї родини дуже схожі між собою, але відрізняються положенням SH2-доменів, тому їх часто відносять до окремих родин.

Транскрипційний фактор Supt6h є архаїчним протеїном, який зберігся від дріжджів до людини [34]. Він містить найпримітивніший варіант SH2-подібних послідовностей, що трапляються лише у дріжджах. На

відміну від більшості SH2-вмісних протеїнів, Supt6h не розширив своє різноманіття у більш складних організмах. Але той факт, що SH2-домен зберігся у Supt6h, свідчить про важливість його функціональної ролі в організмі. Слід також зазначити, що SH2-домен протеїну Supt6h не має рTyr-спорідненості. Це притаманно багатьом іншим SH2-доменам. Так, член родини протеїнів JAK TYK2 має His, а не критичний ArgB5, який координує фосфогрупу рTyr. Хоча SH2-домени людини JAK1, JAK2, JAK3 мають ArgB5, вони відрізня-

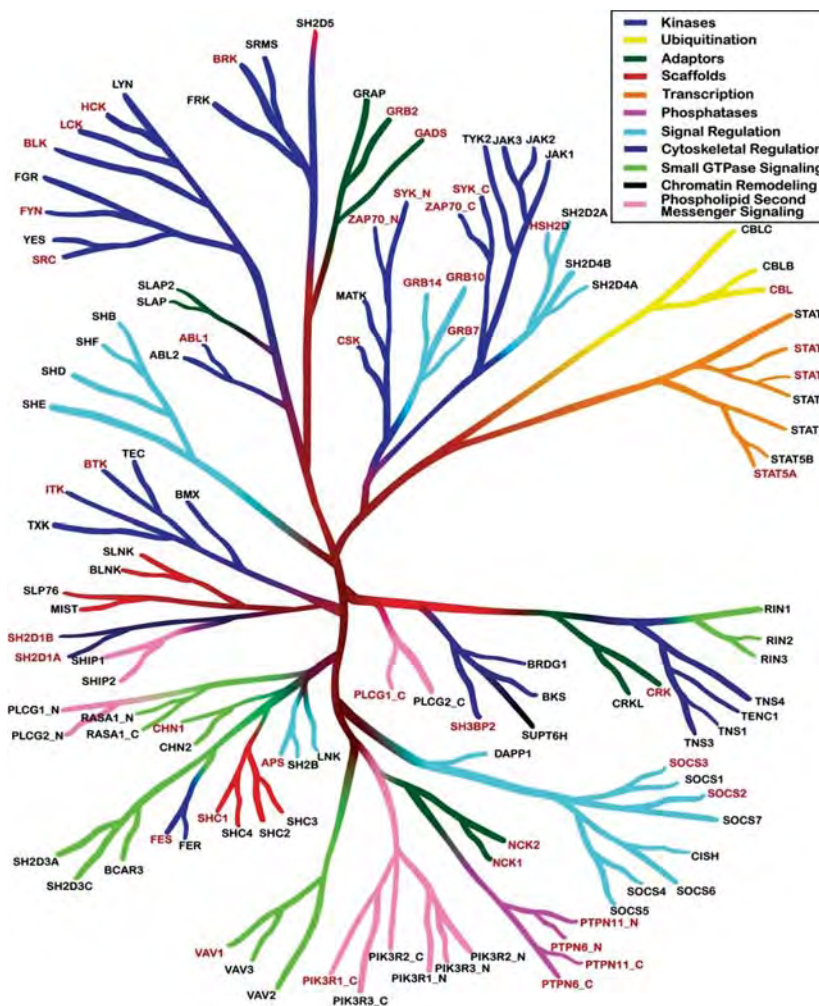


Рис. 5. Дендрограма SH2-доменів людини, яка демонструє послідовну подібність між SH2-доменами, наведеними в таблиці [33]

ються в N-кінцевій частині. Заміна ArgB5 у JAK1 SH2-домени не впливає на локалізацію і функціонування JAK1 [35]. Інтактний SH2-домен потрібен для JAK для того, щоб зв'язуватись із цитокиновими рецепторами. Незважаючи на те, що в JAK SH2-доменах може бути відсутня рTyr-зв'язувальна здатність, вони залишаються важливими рецепторами розпізнавання. Дійсно, моделювання JAK2 передбачає, що SH2-домен може взаємодіяти з N-кінцем FERM-доменом [35]. Так само в SH2-доменах Rin 2 (HisbB5) та SH2D5 може бути відсутнім ArgbB5. Вони також можуть не зв'язувати рTyr-ліганди, хоча наразі відомо про функціонування SH2-доменів в обох протеїнах.

Деякі SH2-домени можуть зв'язувати ліганди без пептиду. Так, SH2-домен фосфатидилінозиту (PI) може зв'язувати PI (3, 4, 5) P3, який перешкоджає розпізнаванню рTyr-вмісних пептидів і, таким чином, забезпечує зворотний зв'язок інгібування

SH2-фосфопротеїнових взаємодій. Подібно до цього Src SH2 може зв'язатись із PIP3 [фосфатидилінозитол (3, 4, 5) трифосфат].

Отже, найбільш перспективні, але при цьому й складні, методи МД дають змогу враховувати конформаційну рухливість не лише ліганду, але й рецептора. У кожному окремому випадку методика проведення МД є різною залежно від структурних і функціональних особливостей протеїну-мішені. Проведений аналіз різноманіття SH2-доменів, їхніх біохімічних властивостей доповнює наявну інформацію щодо протеїнів тирозинкіназ та тирозинфосфатаз [36], а також організації та функцій SH2-вмісних протеїнів. Розглянуті дослідження SH2-доменів методами МД уможливають оптимізацію шляхів створення (дизайну) нових фармацевтичних препаратів для лікування хвороб, пов'язаних із функціонуванням SH2-доменів.



## ЖИТЕПАТЫПА

1. *Alm E., Arkin A. P.* Biological networks // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2003. — V 13. — P. 193–202.
2. *Claverie J. M.* Gene number. What if there are only 30,000 human genes? // *Science.* — 2001. — V. 291. — P. 1255–1257.
3. *Cesareni G., Ceol A., Gavrila C. et al.* Comparative interactomics // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 1828–1833.
4. *Pieroni E., de la Fuente van Bentem S., Mancosu G. et al.* Protein networking: insights into global functional organization of proteomes // *Proteomics.* — 2008. — V. 8. — P. 799–816.
5. *Li S., Armstrong C. M., Bertin N. et al.* A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans* // *Science.* — 2004. — V. 303. — P. 540–543.
6. *Rual J. F., Venkatesan K., Hao T. et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network // *Nature.* — 2005. — V. 43, N 7062. — P. 1173–1178.
7. *Stelzl U., Worm U., Lalowski M. et al.* A human protein-protein interaction network // *Cell.* — 2005 — V. 122. — P. 957–968.
8. *Pawson T.* Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems // *Ibid.* — 2004. — V. 116. — P. 191–203.
9. *Lengauer T., Rarey M.* Computational methods for biomolecular docking // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1996. — V 6. — P. 402–406.
10. *Косинский Ю.А., Пырков Т.В., Луценко С.В., Ефремов Р. Г.* Предсказание структуры комплексов белок-лиганд: от компьютерной модели к биологической функции // *РХЖ.* — 2006 — Т. 2. — P. 36–44.
11. *Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications // *Nat. Rev. Drug. Disc.* — 2004. — V. 3. — P. 935–949.
12. *Shoichet B. K., Kuntz I. D., Bodian D. L.* Molecular docking using shape descriptors // *J. Comput. Chem.* — 2004. — V. 13. — P. 380–397.
13. *Cai W., Shao X., Maigret B.* Protein-ligand recognition using spherical harmonic molecular surfaces: towards a fast and efficient filter for large virtual throughput screening // *J. Mol. Graph. Model.* — 2002. — V. 20. — P. 313–328.
14. *Morris R. J., Najmanovich R. J., Kahraman A., Thornton J. M.* Real spherical harmonic expansion coefficients as 3D shape descriptors for protein binding pocket and ligand comparisons // *Bioinformatics.* — 2005. — V. 21, N 10. — P. 2347–2355.
15. *Kahraman A., Morris R. J., Laskowski R. A., Thornton J. M.* Shape variation in protein binding pockets and their ligands // *J. Mol. Biol.* — 2007. — V. 368, N 1. — P. 283–301.
16. *Meng E. C., Shoichet B. K., Kuntz I. D.* Automated docking with grid-based energy evaluation // *J. Comput. Chem.* — 2004. — V. 13. — P. 505–524.
17. *Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *Ibid.* — 1998. — V. 19. — P. 1639–1662.
18. *Feig M., Onufriev A., Lee M. S. et al.* Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures // *Ibid.* — 2004. — V. 25, N 2. — P. 265–284.
19. *Jain A. N.* Scoring functions for protein-ligand docking // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2006. — V. 7, N 5. — P. 407–420.
20. *Lensink M. F., Mendez R., Wodak S. J.* Docking and scoring protein complexes // *Proteins.* — 2007. — V. 69, N 4. — P. 704–718.
21. *Robertson T. A., Varani G.* An all-atom, distance-dependent scoring function for the prediction of protein-DNA interactions from structure // *Ibid.* — 2007. — V. 66, N 2. — P. 359–374.
22. *Bohm H. J.* Prediction of binding constants of protein ligands: a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs // *J. Comput. Aided Mol. Des.* — 1998. — V. 12, N 4. — P. 309–323.
23. *Betts M. J., Sternberg M. J.* An analysis of conformational changes on protein-protein association: implications for predictive docking // *Prot. Eng.* — 1999. — V. 12, N 4. — P. 271–283.
24. *Jorgensen W. L.* Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding // *Science.* — 1991. — V. 254. — P. 954–955.
25. *Liu B. A., Jablonowski K., Raina M. et al.* The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling // *Mol. Cell.* — 2006. — V. 22, N 6. — P. 851–868.
26. *Gu H., Neel B. G., Pao L.* The Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling // *Trends Biochem. Sci.* — 2003. — V. 28, N 6. — P. 284–293.
27. *Pawson T., Gish G. D., Nash P.* SH2 domains, interaction modules and cellular wiring // *Trends Cell Biol.* — 2001. — V. 11, N 12. — P. 504–511.
28. *Huang H., Li L., Wu C. et al.* Defining the specificity space of the human SRC homology 2 domain // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2008. — V. 7, N 4. — P. 768–784.
29. *Czar M. J., Kersh E. N., Mijares L. A. et al.* Altered lymphocyte responses and cytokine production in mice deficient in the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A/DSHP/SAP // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2001. — V. 98. — P. 7449–7454.

30. *Buday L., Wunderlich L., Tamás P.* The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton // *Cell. Signal.* — 2002. — V. 14, N 9. — P. 723–731.
31. *Chiang Y. J., Kole H. K., Brown H. et al.* Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation // *Nature.* — 2000. — V. 403, N 6766. — P. 216–220.
32. *Depetris R. S., Hu J., Gimpelevich I. et al.* Structural basis for inhibition of the insulin receptor by the adaptor protein grb14 // *Mol. Cell.* — 2005. — V. 20, N 2. — P. 325–333.
33. <http://sh2.uchicago.edu/tree.html>.
34. *Giordanetto F., Kroemer R. T.* Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7 // *Prot. Eng.* — 2002. — V. 15, N 9. — P. 727–737.
35. *Radtke S., Haan S., Jorissen A. et al.* The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280, N 27. — P. 25760–25766.
36. *Manning G., Whyte D. B., Martinez R. et al.* The protein kinase complement of the human genome // *Science.* — 2002. — V. 298, N 5600. — P. 1912–1934.

### МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА С УЧАСТИЕМ SH2-ДОМЕНОВ

*В. В. Гурмач  
О. М. Балинский  
М. О. Платонов  
П. А. Бориско  
Ю. И. Прилуцкий*

Киевский национальный университет  
имени Тараса Шевченко

*E-mail: gyrmach@gmail.com*

Создание новейших фармацевтических препаратов для лечения болезней, связанных с нарушениями функционирования протеиновых комплексов, является важной медико-социальной проблемой, что требует комплексного подхода к ее решению, в том числе учета последних достижений в области компьютерного моделирования биологических процессов.

В работе обобщены данные литературы по структуре, функционированию, классификации молекулярных нарушений доменов SH2 (Src Homology), а также предложено собственную методику молекулярного докинга, как одного из наиболее перспективных методов фармакологических исследований. Показано, что наибольший интерес с точки зрения практического применения для получения новых патентоспособных ингибиторов протеин-протеиновых взаимодействий методом молекулярного докинга представляют именно SH2-домены, поскольку они принимают активное участие во внутриклеточной передаче сигналов, выступая посредниками этих специфических взаимодействий.

**Ключевые слова:** протеиновые комплексы, SH2-домены, молекулярный докинг.

### MOLECULAR DOCKING METHOD INVOLVING SH2-DOMAINS

*V. V. Hurmach  
A. M. Balynskyi  
M. O. Platonov  
P. O. Borysko  
Yu. I. Prylutskyi*

Kyiv National Taras Shevchenko University

*E-mail: gyrmach@gmail.com*

The creation of new pharmaceuticals for treating diseases associated with impaired functioning of protein complexes is an important medical and social problem that requires a comprehensive approach to its solution, including consideration of recent advances in computer modeling of biological processes.

The text summarizes literature data about structure, functioning, classification, molecular disturbances of SH2-domains (Src Homology) and also provides description of the method of molecular docking as one of the most promising methods for pharmacological studies. It is shown that SH2-domains are of the most interest in terms of practical applications for new patentable inhibitor protein — protein interactions using molecular docking, because they are actively involved in intracellular signal transmission acting as mediators of specific interactions.

**Key words:** protein complexes, SH2-domains, molecular docking.