

Abstract

Project Code: MRG5680003
Project Title: A Computational and Biochemical Drug Discovery Targeting Protein Kinase C Anti-Latency Agents towards the Eradication of HIV-1 Reservoirs
Investigator: Dr. Nuttee Suree
Email Address: nuttee.suree@cmu.ac.th
Project Period: 3 June 2013 – 2 June 2015

Protein kinase C (PKC) isozymes are important regulatory enzymes that have been implicated in many diseases, including cancer, Alzheimer's disease, and in the eradication of HIV/AIDS. Given its potential clinical ramifications, PKC modulators, e.g. phorbol esters and bryostatin, are also of great interest in the drug development. However, structural detail on the binding between PKC and its modulators, especially bryostatin—the highly potent and non-tumor promoting activator for PKCs, is still lacking. Here we report the first comparative molecular dynamics (MD) study aimed at gaining structural insight into the mechanisms by which the PKC delta activator domain is used in its binding to phorbol ester and bryostatin. Potential energy analysis revealed that PKC-bryostatin complex is energetically more favorable than either free PKC protein or the PKC-phorbol ester complex. The indole Nε1 of the highly homologous Trp252 also forms an H-bond to the C20 ester group on bryostatin. Backbone fluctuations also suggest that this H-bond formation may abrogate the transient interaction between Trp252 and His269, thus dampening the fluctuations observed on the nearby Zn²⁺-coordinating residues.

Moreover, we have also applied the structural knowledge onto the development of computational methods for screening of 896 small molecules from the US NIH Clinical Collection against PKC. Virtual screening and affirmative re-docking, combined with Partial Least Squares (PLS) or Self-Organizing Maps (SOMs) were employed. As a result, we have identified various ligands that were predicted as effective PKC activators. The PLS model anticipated rolitetracycline and pancuronium dibromide with a predicted fold activation of 1.79 and 1.69, respectively, while the SOMs model predicted mecillinam and ketorolac with fold activation values of ca. 1.18. Virtual screening yielded telmisartan and irinotecan with binding affinity values of -8.6 and -8.2 kcal/mol, respectively. Reliability and accuracy of the predicted results from the computational models will ultimately be confirmed using our direct *in vitro* PKC biochemical assay, as well as a cell-based anti-latency assay that we have successfully demonstrated in the case of bryostatin. This research could potentially identify small chemical candidates for reactivating cells that have been latently infected with HIV-1 and could lead to a functional cure for HIV-AIDS.

Keywords: protein kinase C; molecular dynamics simulation; phorbol ester; bryostatin; binding mechanism

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ:	MRG5680003
ชื่อโครงการ:	การค้นคว้าหาตัวยาลำดับวิธีการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์และวิธีการทางชีวเคมีโดยมีเป้าหมายที่โปรตีนไคเนสซี เพื่อนำไปสู่การกำจัดการติดเชื้อเอชไอวี-1 แบบแฝงและการรักษาหายขาด
ผู้วิจัย:	อาจารย์ ดร.นัทธี สूरีย์
อีเมล:	nuttee.suree@cmu.ac.th
ระยะเวลา:	3 มิถุนายน 2556 – 2 มิถุนายน 2558

โปรตีนไคเนสซี (PKC) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการสื่อสารสัญญาณในเซลล์และเกี่ยวข้องกับโรคภัยหลายชนิด อาทิ มะเร็ง โรคอัลไซเมอร์ หรือในการกำจัดการติดเชื้อเอชไอวี-1 แบบแฝง ดังนั้นสารที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนสซี อาทิ กลุ่มสารฟอรัลเอสเทอร์ หรือไบรอสแตติน จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม ข้อมูลเกี่ยวกับการจับเกาะของสารกลุ่มนี้กับโปรตีนไคเนสซียังมีจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับไบรอสแตตินนั้น ยังไม่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการจับเกาะ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาด้วยการเปรียบเทียบพลศาสตร์โมเลกุลจำลอง (molecular dynamics simulations) ของโครงสร้างโปรตีนไคเนสซีที่จับเกาะด้วยฟอรัลเอสเทอร์ หรือไบรอสแตติน ณ ตำแหน่งบริเวณจับกับตัวเร่งของโปรตีน ค่าพลังงานศักย์ของการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนระบุว่า เมื่อโปรตีนไคเนสซีจับกับไบรอสแตตินนั้น จะมีเสถียรภาพมากกว่าขณะจับกับฟอรัลเอสเทอร์หรือแม้กระทั่งโปรตีนเปล่า เสถียรภาพนี้เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างอะตอม NE1 ของวงอินโดล (indole) ในกรดอะมิโนทริปโตฟาน 252 ของโปรตีนไคเนสซี กับหมู่เอสเทอร์ ณ ตำแหน่ง C20 ของไบรอสแตติน ค่าการแปรปรวนเชิงพลศาสตร์ (dynamics fluctuation) ชี้ว่า เติมกรดอะมิโนทริปโตฟาน 252 นั้นมีอันตรกิริยากับกรดอะมิโนฮิสติดีน 269 ซึ่งเป็นหนึ่งในศูนย์กลางจับกับโคแฟกเตอร์ Zn^{2+} และการแปรผันทิศทางของทริปโตฟานนั้นทำให้เกิดความไม่เสถียรของโครงสร้าง เมื่อทริปโตฟานจับกับตัวยาลไบรอสแตตินแล้วนั้น การแปรผันทิศทางจึงถูกจำกัด และก่อให้เกิดเสถียรภาพขึ้นในโครงสร้างใกล้เคียงโดยรวมขึ้นได้

ผู้วิจัยยังได้นำความรู้ในด้านโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนไคเนสซีมาช่วยในกระบวนการค้นหายาใหม่ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของโปรตีนโดยทำการคัดเลือกในฐานข้อมูลสารคล้ายยาของสถาบันสุขภาพสหรัฐอเมริกาจำนวน 896 สาร เมื่อศึกษาการจับเกาะด้วย molecular docking และการทำการทดลองเชิงชีวเคมีแล้วจึงได้วิเคราะห์ต่อด้วยแบบจำลองคณิตศาสตร์สองชนิดคือ Partial Least Squares (PLS) และ Self-Organizing Maps (SOMs) ผลของ virtual screening และ molecular docking ทำให้ค้นพบสารคล้ายยาบางตัวที่อาจมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนสซี อาทิ rolitetracycline, pancuronium dibromide, mecillinam, ketorolac, telmisartan และ irinotecan นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้นำเอาวิธีการทดสอบฤทธิ์ของสารคล้ายยาในการกระตุ้นนอกจากการติดเชื้อเอชไอวี-1 แบบแฝงโดยอาศัยเซลล์ทดลองจำเพาะ มาทดลองใช้กับสารไบรอสแตติน และพบว่าประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ต่อในการศึกษาผลของยาตัวใหม่ที่ค้นพบได้เหล่านี้ในระดับเซลล์ดังกล่าวต่อไป ดังนั้น งานวิจัยนี้เป็นวิธีการใหม่ที่บูรณาการการค้นคว้าหาตัวยาลำดับวิธีการคำนวณด้วยคอมพิวเตอร์และทางชีวเคมีเข้าด้วยกัน เพื่อนำไปสู่การกำจัดการติดเชื้อเอชไอวี-1 แบบแฝงและการรักษาหายขาดได้