

Сайт связывания NADPH NADPH-оксидазы 2 является мишенью ингибитора GSK2795039 и его аналогов

Мухина К.*, Анашкина А., Кечко О., Митькевич В.

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

* k.a.mukhina@mail.ru

Ключевые слова: NOX2; Болезнь Альцгеймера; микроглия; GSK2795039; молекулярное моделирование; докинг; молекулярная динамика

Мотивация и цель: Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенная нейродегенеративная патология. Недавние исследования показывают, что активация микроглии, вызванная бета-амилоидом (Аβ), играет важную роль в развитии окислительного стресса при патогенезе БА. Основным источником активных форм кислорода (АФК) в мозге является NADPH-оксидаза 2 (NOX2), которая расположена на мембране микроглиальных клеток. Мы предполагаем, что ее ингибирование, вследствие снижения окислительного стресса, может стать эффективной терапией БА. Существует селективный ингибитор NOX2 – GSK2795039 (GSK) и его аналоги [1, 2]. Целью данной работы было определение сайта связывания этих ингибиторов и оценка аффинности связывания и селективности по отношению к семейству NAD(P)H оксидаз, а также их способности ингибировать окислительный стресс в клетках микроглии человека.

Методы и алгоритмы: Структуры ингибиторов NOX2 взяты из статьи [2] (табл. 1). В качестве контроля взята структура NADPH. Исходные структуры следующих изоформ NADPH-оксидаз взяты из PDB: NOX2 (8wej), NOX5 (5o0x), DUOX1 (6wxv). Структуры оксидаз NOX1, NOX3, NOX4, DUOX2 были смоделированы программой AlphaFold (показатель достоверности (pLDDT) для NADPH связывающего участка > 95) и верифицированы методом молекулярной динамики. Молекулярная динамика проводилась программой GROMACS в течение 10 нс для более точного определения координат атомов модели. Молекулярное моделирование комплексов NOX2 и других изоформ с ингибиторами и докинг выполняли с помощью программы МОЕ. Для каждого лиганда с каждой из изоформ было получено по 10 конформаций взаимодействия с соответствующими значениями аффинности. Далее сравнили аффинность связывания ингибиторов в каждой изоформе и определили аффинность связывания ингибиторов в разных изоформах, т. е. селективность. Клетки микроглии человека HMC3 инкубировали 24 ч с добавлением ингибиторов GSK, GSK18, GSK28 в концентрации 25 мкМ и Аβ₁₋₄₂ 10 мкМ (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Гейдельберг, Германия). Ингибирование окислительного стресса, вызванного Аβ, оценивали по проточной цитометрии, используя краситель на АФК дигидрорадамин-123 (Ex/Em = 507/525 нм, ThermoFisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Количество мертвых клеток в популяции оценивали с помощью красителя иодида пропидия (Ex/Em = 535/617 нм; Sigma, Сент-Луис, Миссури, США).

Результаты: Были построены модельные структуры комплексов NAD(P)H оксидаз с ингибиторами. Мы определили, что исследованные ингибиторы с наибольшей аффинностью связываются с NOX2 (табл. 2). Сайт связывания

ингибиторов совпадает с сайтом связывания NADPH и включает аминокислоты Arg73, Leu76, Asp95, Asn97, Leu98, Phe202, Tyr324, Phe326, Trp337, Pro339, Thr341, Gly392, Thr393, Asn569, Phe570 (рис. 1). Были обнаружены наиболее аффинные ингибиторы: GSK1, 14, 15, 26, однако они показали наименьшую селективность (см. табл. 2). При этом за увеличение аффинности отвечают взаимодействия с аминокислотными остатками Asp95, Pro339, Phe340, Asn569, Phe570. Наилучшее действие по снижению окислительного стресса клеток показал ингибитор GSK18, достоверно снизив количество АФК на 150 % относительно клеток с Аβ и на 60 % относительно контроля (рис. 2).

Таблица 1. Структуры ингибитора NADPH-оксидазы 2 (NOX2) GSK2795039 (GSK) и его аналогов из работы [2]

NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE
GSK		GSK6		GSK12		GSK18		GSK24	
GSK1		GSK7		GSK13		GSK19		GSK25	
GSK2		GSK8		GSK14		GSK20		GSK26	
GSK3		GSK9		GSK15		GSK21		GSK27	
GSK4		GSK10		GSK16		GSK22		GSK28	
GSK5		GSK11		GSK17		GSK23			

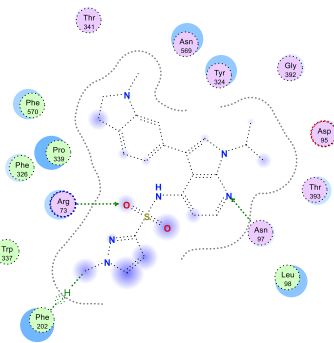
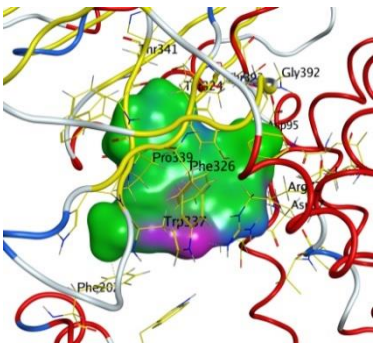


Рис. 1. Сайт связывания ингибиторов NADPH-оксидазы 2 включает аминокислоты Arg73, Leu76, Asp95, Asn97, Leu98, Phe202, Tyr324, Phe326, Trp337, Pro339, Thr341, Gly392, Thr393, Asn569, Phe570

Таблица 2. Аффинность связывания ингибиторов с NAD(P)H-оксидазами

	NOX2	NOX4	DUOX1	NOX1	NOX3	DUOX2
GSK	-8,6	-7,7	-7,1	-6,6	-6,4	-5,5
GSK1	-9,2	-7,6	-8,2	-7,1	-6,6	-6,9
GSK2	-9,0	-7,6	-7,8	-6,5	-7,1	-6,2
GSK3	-8,3	-6,7	-7,4	-6,8	-6,9	-5,9
GSK4	-9,0	-7,5	-7,5	-6,8	-7,4	-5,7
GSK5	-8,5	-7,8	-7,2	-6,3	-6,8	-5,5
GSK6	-9,0	-7,9	-7,5	-6,2	-7,0	-6,1
GSK7	-8,4	-7,3	-6,9	-6,4	-6,3	-6,4
GSK8	-8,8	-7,7	-7,5	-6,6	-6,2	-5,9
GSK9	-9,0	-7,9	-7,5	-6,2	-7,0	-6,1
GSK10	-8,5	-7,8	-7,2	-6,3	-6,8	-5,6
GSK11	-8,6	-7,6	-7,6	-6,7	-6,7	-5,4
GSK12	-8,8	-7,2	-7,5	0,0	-7,0	-6,4
GSK13	-8,8	0,0	-8,2	-6,8	-6,7	-6,4
GSK14	-9,5	0,0	-8,5	-6,1	-6,3	-5,9
GSK15	-9,2	-8,0	-7,9	-7,0	-7,0	-6,3
GSK16	-8,5	-6,8	-7,1	-6,4	-6,1	-6,4
GSK17	-8,7	-7,8	-7,3	-6,5	-6,1	-5,9
GSK18	-8,3	-6,8	-7,4	-6,3	-6,2	-5,7
GSK19	-8,5	-6,7	-7,0	-6,3	-6,8	-5,5
GSK20	-8,6	-7,3	-7,5	-6,2	-6,7	-5,6
GSK21	-9,0	-8,1	-8,2	-7,0	0,0	-6,4
GSK22	-8,6	-7,5	-7,7	-5,4	-6,6	-5,9
GSK23	-8,5	-8,5	-7,6	-6,6	-6,3	-6,8
GSK24	-8,4	-7,7	-7,4	-6,8	-6,9	-7,1
GSK25	-8,3	-7,2	-7,1	-5,9	-7,0	-6,6
GSK26	-9,2	0,0	-8,1	-6,7	-6,4	-7,1
GSK27	-8,7	-7,6	-7,3	-6,2	-6,1	-5,7
GSK28	-8,3	-7,2	-7,4	-6,3	-6,3	-5,6
NADPH	-11,6	-9,0	-9,5	-7,5	-8,0	-7,8

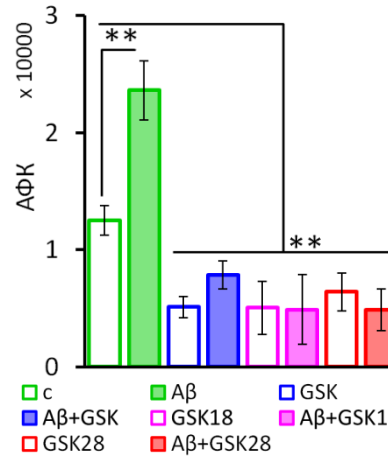


Рис. 2. Влияние ингибиторов NOX2 на уровень АФК в контрольных и Аβ-активированных клетках НМС3. Клетки обрабатывали 25 μM GSK, GSK18, GSK28 и 10 μM Аβ в течение 24 ч. Значения представляют собой среднее четырёх независимых измерений±SD. (** $p<0,01$)

Выводы: Впервые определены аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии с ингибитором GSK2795039 и его аналогами, локализованные в сайте связывания NADPH. Рассчитана аффинность связывания библиотеки ингибиторов с изоформами NAD(P)H оксидаз. Наилучший биологический эффект показал ингибитор GSK18. Установлено, что способность ингибиторов препятствовать окислительному стрессу в большей мере определяется селективностью, чем аффинностью.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 19-74-30007).

NADPH binding site NADPH oxidase 2 is a target of the inhibitor GSK2795039 and its analogues

Mukhina K.*, Anashkina A., Kechko O., Mitkevich V.
Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia
* k.a.mukhina@mail.ru

Key words: NOX2; Alzheimer's disease; microglia; GSK2795039; molecular modeling; docking; molecular dynamics

Motivation and Aim: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. Recent studies suggest that amyloid beta (A β)-induced microglial activation plays an important role in the development of oxidative stress in AD pathogenesis. The major source of reactive oxygen species (ROS) in the brain is NADPH oxidase 2 (NOX2), which is located on the membrane of microglial cells. We hypothesise that its inhibition, by reducing oxidative stress, may become an effective therapy for Alzheimer's disease. There is a selective inhibitor of NOX2 – GSK2795039 (GSK) and its analogues [1, 2]. The aim of this work was to determine the binding site of these inhibitors and to evaluate their binding affinity and selectivity towards the NAD(P)H oxidase family, as well as their ability to inhibit oxidative stress in human microglial cells.

Methods and Algorithms: The structures of NOX2 inhibitors were taken from the article [2] (Table 1). The structure of NADPH was used as a control. The original structures of the following isoforms of NADPH oxidases were taken from the PDB: NOX2 (8wej), NOX5 (5o0x), DUOX1 (6wxv). The structures of the oxidases NOX1, NOX3, NOX4, DUOX2 were modelled with the program AlphaFold (confidence score (pLDDT) for the NADPH-binding site > 95) and verified by molecular dynamics. Molecular dynamics was performed using the GROMACS program for 10 nanoseconds to more accurately determine the coordinates of the model atoms. Molecular modelling of complexes of NOX2 and other isoforms with inhibitors and docking were performed using the MOE program. For each ligand with each isoform, 10 interaction conformations with corresponding affinity values were obtained. The binding affinity of the inhibitors in each isoform was then compared and the binding affinity of the inhibitors in different isoforms, i.e. selectivity, was determined. Human microglial cells HMC3 were incubated for 24 hours with the addition of GSK, GSK18, GSK28 inhibitors at a concentration of 10 μ M. Inhibition of oxidative stress induced by A β 1-42 10 μ M (Peptide Specialty Laboratories GmbH, Heidelberg, Germany) was assessed by flow cytometry using the ROS dye dihydrorhodamine-123 (Ex/Em = 507/525 nm, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). The number of dead cells in the population was assessed using propidium iodide dye (Ex/Em = 535/617 nm; Sigma, St. Louis, MO, USA).

Results: Model structures of complexes of NAD(P)H oxidases with inhibitors were constructed. We found that the inhibitors tested bind to NOX2 with the highest affinity (Table 2). The inhibitor binding site coincides with the NADPH binding site and includes the amino acids Arg73, Leu76, Asp95, Asn97, Leu98, Phe202, Tyr324, Phe326, Trp337, Pro339, Thr341, Gly392, Thr393, Asn569, Phe570 (Fig. 1). The highest affinity inhibitors were found to be: GSK1, 14, 15, 26, but they showed the lowest selectivity (Table 2). In this case, interactions with amino acid residues Asp95, Pro339, Phe340, Asn569, Phe570 are responsible for the increase in affinity. The GSK18 inhibitor showed the best effect in reducing oxidative stress in the cells, significantly reducing the amount of ROS by 150 % compared to cells with A β and by 60 % compared to the control (Fig. 2).

Table 1. Structures of the NADPH oxidase 2 (NOX2) inhibitor GSK2795039 (GSK) and its analogues from [2]

NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE	NAME	STRUCTURE
GSK		GSK6		GSK12		GSK18		GSK24	
GSK1		GSK7		GSK13		GSK19		GSK25	
GSK2		GSK8		GSK14		GSK20		GSK26	
GSK3		GSK9		GSK15		GSK21		GSK27	
GSK4		GSK10		GSK16		GSK22		GSK28	
GSK5		GSK11		GSK17		GSK23			

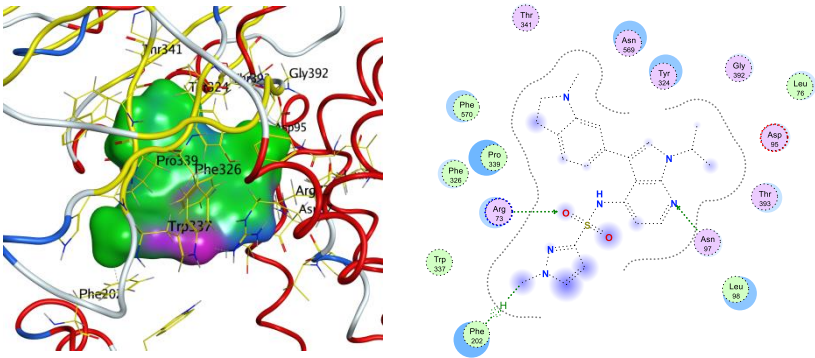


Fig. 1. The binding site for NADPH oxidase 2 inhibitors includes the amino acids Arg73, Leu76, Asp95, Asn97, Leu98, Phe202, Tyr324, Phe326, Trp337, Pro339, Thr341, Gly392, Thr393, Asn569, Phe570

Table 2. Binding affinity of inhibitors with NAD(P)H oxidases

	NOX2	NOX4	DUOX1	NOX1	NOX3	DUOX2
GSK	-8,6	-7,7	-7,1	-6,6	-6,4	-5,5
GSK1	-9,2	-7,6	-8,2	-7,1	-6,6	-6,9
GSK2	-9,0	-7,6	-7,8	-6,5	-7,1	-6,2
GSK3	-8,3	-6,7	-7,4	-6,8	-6,9	-5,9
GSK4	-9,0	-7,5	-7,5	-6,8	-7,4	-5,7
GSK5	-8,5	-7,8	-7,2	-6,3	-6,8	-5,5
GSK6	-9,0	-7,9	-7,5	-6,2	-7,0	-6,1
GSK7	-8,4	-7,3	-6,9	-6,4	-6,3	-6,4
GSK8	-8,8	-7,7	-7,5	-6,6	-6,2	-5,9
GSK9	-9,0	-7,9	-7,5	-6,2	-7,0	-6,1
GSK10	-8,5	-7,8	-7,2	-6,3	-6,8	-5,6
GSK11	-8,6	-7,6	-7,6	-6,7	-6,7	-5,4
GSK12	-8,8	-7,2	-7,5	0,0	-7,0	-6,4
GSK13	-8,8	0,0	-8,2	-6,8	-6,7	-6,4
GSK14	-9,5	0,0	-8,5	-6,1	-6,3	-5,9
GSK15	-9,2	-8,0	-7,9	-7,0	-7,0	-6,3
GSK16	-8,5	-6,8	-7,1	-6,4	-6,1	-6,4
GSK17	-8,7	-7,8	-7,3	-6,5	-6,1	-5,9
GSK18	-8,3	-6,8	-7,4	-6,3	-6,2	-5,7
GSK19	-8,5	-6,7	-7,0	-6,3	-6,8	-5,5
GSK20	-8,6	-7,3	-7,5	-6,2	-6,7	-5,6
GSK21	-9,0	-8,1	-8,2	-7,0	0,0	-6,4
GSK22	-8,6	-7,5	-7,7	-5,4	-6,6	-5,9
GSK23	-8,5	-8,5	-7,6	-6,6	-6,3	-6,8
GSK24	-8,4	-7,7	-7,4	-6,8	-6,9	-7,1
GSK25	-8,3	-7,2	-7,1	-5,9	-7,0	-6,6
GSK26	-9,2	0,0	-8,1	-6,7	-6,4	-7,1
GSK27	-8,7	-7,6	-7,3	-6,2	-6,1	-5,7
GSK28	-8,3	-7,2	-7,4	-6,3	-6,3	-5,6
NADPH	-11,6	-9,0	-9,5	-7,5	-8,0	-7,8

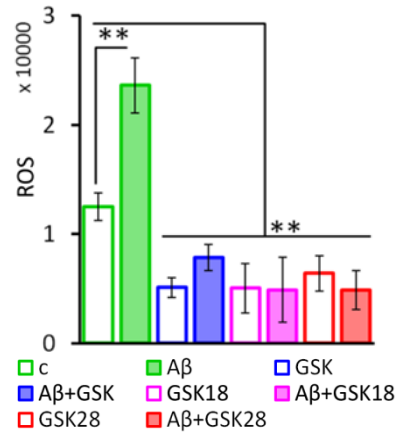


Fig. 2. Effect of NOX2 inhibitors on ROS levels in control and Aβ-activated HMC3 cells. Cells were treated with 25 μM GSK, GSK18, GSK28 and 10 μM Aβ for 24 h. Values are the mean of four independent measurements±SD. ** $p<0.01$

Conclusion: For the first time, the amino acid residues involved in the interaction with the inhibitor GSK2795039 and its analogues located in the NADPH binding site have been identified. The binding affinity of the inhibitor library to NAD(P)H oxidase isoforms was calculated. The GSK18 inhibitor showed the best biological activity. It was found that the ability of inhibitors to prevent oxidative stress is determined by selectivity rather than affinity.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 19-74-30007).

Список литературы/References

1. Hirano K., Chen W.S., Chueng A.L. et al. Discovery of GSK2795039, a Novel Small Molecule NADPH Oxidase 2 Inhibitor. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(5):358-374. doi 10.1089/ars.2014.6202
2. Mason H., Rai G., Kozyr A. et al. Development of an improved and specific inhibitor of NADPH oxidase 2 to treat traumatic brain injury. *Redox Biol.* 2023;60:102611. doi 10.1016/j.redox.2023.102611