

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

NAYARA MARIA BERNHARDT LEVIN

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE INIBIDORES COM
QUINASES DEPENDENTES DE CICLINA**

Porto Alegre, RS

2016

NAYARA MARIA BERNHARDT LEVIN

**ESTUDO COMPUTACIONAL DA INTERAÇÃO DE INIBIDORES COM
QUINASES DEPENDENTES DE CICLINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr

Porto Alegre, RS

Ficha Catalográfica

L665e Levin, Nayara Maria Bernhardt

Estudo computacional da interação de inibidores com quinases dependentes de ciclina / Nayara Maria Bernhardt Levin . – 2016.

43 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr.

1. Quinase dependente de ciclina. 2. desenho de fármacos. 3. função scoring. 4. aprendizagem de máquina. 5. cristalografia. I. Azevedo Jr, Walter Filgueira de.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RESUMO

Quinases dependentes de ciclina (CDKs) são sistemas biológicos de interesse para o desenvolvimento de protocolos de *docking* e funções *score*, devido à abundância de estruturas cristalográficas complexadas para as quais há disponibilidade de dados de afinidade de ligação. Neste trabalho relatamos a aplicação de uma abordagem computacional integrada para realizar o *docking* molecular em um conjunto de dados composto por 176 estruturas cristalográficas de CDK em complexo com inibidores. De nosso conhecimento, este é o maior conjunto de dados de estruturas cristalográficas de CDKs utilizado para simulação de *docking* molecular. Nossos resultados indicam que a estratégia proposta para *docking* de CDKs gera poses com desvio médio quadrático abaixo de 2,0 Å para a maioria das estruturas do conjunto de dados. Além disso, descrevemos o desenvolvimento das funções *score* adaptados às CDKs. A análise estatística dos resultados de *pré-docking* e *re-docking*, empregando as funções *score* propostas para CDKs, indica que estas funções são capazes de prever afinidade com o melhor desempenho quando comparado com as funções previamente relatadas para CDKs.

Palavras-chave: Quinase dependente de ciclina; desenho de fármacos; função *scoring*; aprendizagem de máquina, cristalografia.

ABSTRACT

Cyclin-dependent kinases (CDKs) comprise an interesting biological system for development of docking protocols and scoring functions, due to the abundance of complexed structures for which binding affinity data is available. Here, we report application of an integrated computational approach to carry out docking against a data set composed of 176 structures of CDK in complex with inhibitors. To our knowledge, this is the largest data set of CDK crystallographic structures submitted to molecular docking simulation. Our results indicate that the proposed strategy for docking against CDKs generates poses with docking root-mean square deviation below 2.0 Å for most of the structures in the data set. In addition, we describe the development of scoring functions tailored to CDKs. Statistical analysis of pre-docking and re-docking results, using the proposed scoring functions for CDKs, indicates that these functions are able to predict affinity with better performance when compared with previously reported benchmarks for CDKs.

Keywords: Cyclin-dependent kinase; drug design; scoring function; machine learning; crystallography

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Deus que iluminou minha trajetória, guiando sempre meus passos para que tornasse esta caminhada uma jornada de grandes aprendizados, vivências e amizades.

Agradeço meu porto seguro, meu esposo Felipe Hoppe Levin. Por todo incentivo, carinho, troca de ideias, por acompanhar esta caminhada ao meu lado. Obrigada por todo o carinho, compreensão e paciência. Obrigada pelo melhor presente que poderíamos estar esperando: nosso Lucas.

Agradeço a minha família: minha mãe (Maria Nelci Vieira Bernhardt), meu pai (Heitor Neto Bernhardt), minhas irmãs (Luciana C. Bernhardt e Muriel F. Bernhardt e esposo), e a família do meu esposo que me acolheu e incentivou como filha. Todos me apoiaram muito durante esta caminhada.

Faço um agradecimento especial ao Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr por aceitar ser meu orientador ainda quando eu estava fazendo a especialização, mesmo sem me conhecer direito. Desde o início confiou em mim, ajudou-me de modo ímpar com seus conhecimentos, seu exemplo de dedicação pela profissão e amizade sincera.

Não posso deixar de agradecer aos colegas que passaram pelo grupo de pesquisa durante estes dois anos: Bruna Boldrini de Mattos, Gabriela Heck, Mariana Xavier, Maurício Boff de Àvila, Nathália Lemes, Val Oliveira Pintro. Obrigada pela troca de conhecimentos, pela parceria e pelas conversas sempre animadas.

Obrigada também às amigas que a PUCRS me trouxe durante este período: Ana Paula Dagnino, Maria do Carmo Dantas de Santana (Carminha), Carolina Souza, Jessica Soares e Priscilla Pail. Amizades que quero levar comigo pela vida.

Agradeço à CAPES e à PUCRS por tornar o sonho de concluir o mestrado algo possível.

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Quinases Dependentes de Ciclina (Cdks) e o Ciclo Celular	8
1.2 CDKs como alvo terapêutico	10
1.3 Estudo computacional (proteína-ligante).....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	19
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
6 CONCLUSÕES.....	27
7 REFERÊNCIAS	28
8 ANEXOS.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quinases Dependentes de Ciclina (Cdks) e o Ciclo Celular

Devido ao seu importante papel no controle da progressão do ciclo celular, quinases dependentes de ciclina (EC 2.7.11.21) (CDK) vêm sendo amplamente estudadas como proteínas alvo para o desenvolvimento de fármacos (Morgan, 1995; Murray, 1994).

Em células eucarióticas, a divisão celular é constituída de dois processos consecutivos que são a replicação do DNA e a segregação de cromossomos replicados em duas células separadas. O ciclo celular, originalmente, era dividido em dois estágios: Mitose (M), onde ocorre a divisão nuclear; e a Interfase, o intervalo entre duas fases M. Os estágios da Mitose consistem em prófase, metáfase, anáfase e telófase. Diferentes técnicas posteriormente revelaram que a Interfase se subdivide em G1, S e G2 (Norbury & Nurse, 1992).

Desta forma, a maioria das transições que ocorrem durante o ciclo celular de células eucarióticas (especialmente entre as fases de Interfase, G1, S, G2 e Mitose) são controladas por quinases dependentes de ciclina (CDKs) que, como o próprio nome diz, dependem de ciclinas para tornarem-se ativas (Morgan, 2007; Hochegger *et al.*, 2008).

Quinases dependentes de ciclina (CDKs) formam uma família de proteínas quinases serina-treonina, que fosforilam de modo específico a serina ou a treonina em diferentes proteínas que possuem níveis variando durante o ciclo celular para controle do mesmo (*check points*). Enquanto monômeros, estas proteínas são inativas, mas, para que se tornem ativas, as CDKs necessitam que ocorra a fosforilação de um local de ativação e da ligação de um ativador (uma ciclina), uma família de proteínas envolvidas no controle e progressão do ciclo celular (Ahmed & Sharma, 2011; Satyanarayana & Kaldis, 2009; Hochegger *et al.*, 2008).

A estrutura cristalográfica da CDK foi determinada pela primeira vez em 1993 (DeBondt *et al.*, 1993). As quinases possuem uma conformação bilobal que é bastante característica, conforme mostrado na Figura 1. Elas possuem um domínio N-terminal com aproximadamente 85 resíduos (em folha beta), um domínio C-terminal predominantemente com aproximadamente 170 aminoácidos (em hélices alfa), e um bolsão de ligação a ATP (adenosina trifosfato) entre os dois lobos

(Pitchuanchom, 2012). Uma análise das estruturas cristalográficas dos complexos formados entre as CDKs e pequenas moléculas inibidoras indica algumas características comuns que foram utilizadas para auxiliar na orientação da concepção computadorizada de inibidores de CDK mais específicos, tais como interações intermoleculares que envolvem uma forquilha molecular composta pelos resíduos Glu 81, Phe 82, Leu 83 na estrutura de CDK2 (De Azevedo *et al.*, 2002). A maior parte dos inibidores de CDK, com as estruturas cristalográficas dos complexos disponíveis, indicou a participação destes resíduos num padrão com “aceitador, doador e aceitador” estreitamente posicionado no bolsão de ligação de ATP (Cavasotto & Abagyan, 2004).

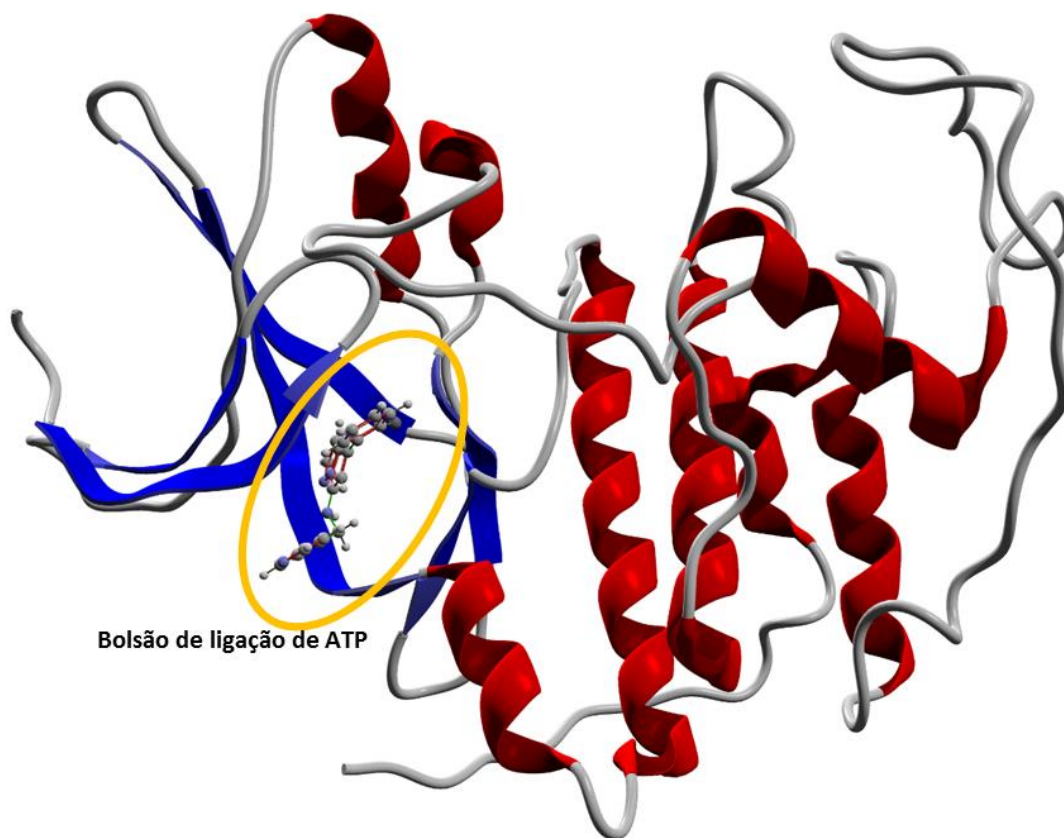


Figura 1. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK2) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 2R3I). Hélices alfa são desenhadas em vermelho e folha beta desenhada em azul. Loops e regiões desordenadas são desenhados em cinza. O inibidor de CDK (5- (2-fluorofenil) -N- (piridin-4-ilmetil) pirazolo [1,5-a] pirimidin-7-amina) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. Esta figura foi gerada com MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 2R3I (Fischmann *et al.*, 2008).

A ativação de uma CDK por uma ciclina ocorre de modo rigidamente controlado. Contudo, a desregulação desta família de proteínas é uma característica importante de várias doenças como o câncer – onde a desregulação do ciclo celular contribui para um crescimento e proliferação descontrolados de células (Malumbres & Barbacid, 2009; Hanahan & Weinberg, 2000).

1.2 CDKs como alvo terapêutico

Recentemente, os inibidores de CDK entraram nos ensaios clínicos de fase III para o desenvolvimento de fármacos anti-câncer, que validam ainda mais a importância de inibidores de CDK no desenvolvimento de uma nova geração de fármacos contra câncer (De Azevedo, 2016).

Com um importante papel regulador da progressão do ciclo celular (G1/S e S) está a CDK2. Há estudos que mostram que uma superexpressão da CDK2 está presente nos casos de câncer de laringe, câncer de mama e melanoma avançado (Abdullah *et al.*, 2011; Georgieva *et al.*, 2001; Weroha *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Já uma hiperativação da CDK2, está associada a uma amplificação e / ou superexpressão das ciclinas A e E em um grande número de cânceres humanos, particularmente no câncer de ovário, mama e carcinoma do endométrio, carcinoma de pulmão e tireóide, osteosarcoma e melanoma (Husdal *et al.*, 2006; Ekberg *et al.*, 2005; Nar *et al.*, 2012; Santala *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2010; Karst *et al.*, 2013; Lockwood *et al.*, 2011; Koutsami *et al.*, 2006). A figura 2 traz uma CDK2 com foco no inibidor acoplado no bolsão de ligação de ATP.

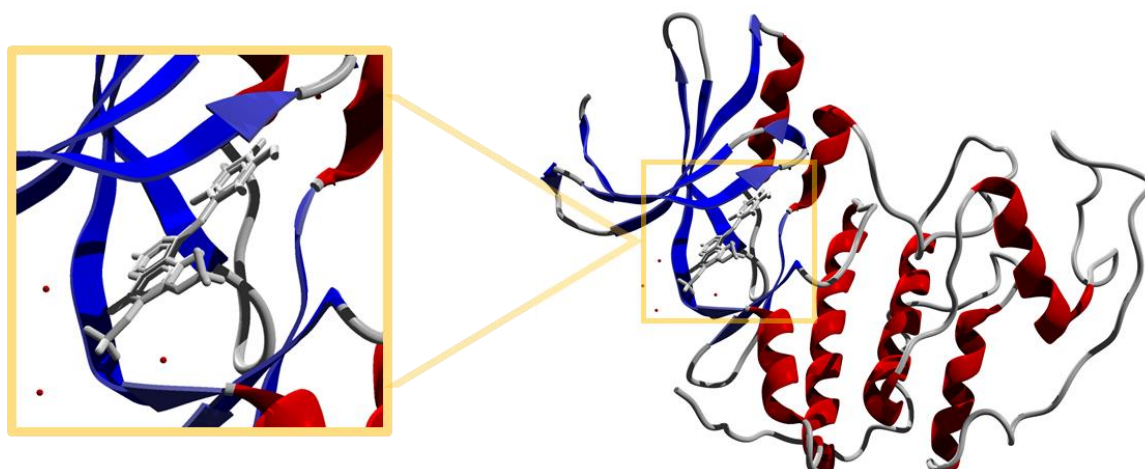


Figura 2. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK2) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 1DI8). O inibidor de CDK (4-[3-hydroxyanilino]-6,7-dimethoxyquinazoline) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. A imagem da proteína foi

gerada utilizando MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 1DI8 (Shewchuk *et al.*, 2000).

Diferentemente das outras CDKs, a CDK5 não está envolvida na regulação do ciclo celular e sim com a cascata de transdução de sinal e moléculas sinalizadoras neuronais, como o glutamato – que em níveis elevados na fenda sináptica (excitotoxicidade) pode levar a a diversas doenças neuronais. (Dhavan & Tsai, 2001; Dhariwala & Rajadhyaksha, 2008). Nos casos de doenças neurodegenerativas (no início e desenvolvimento), há associação da hiperatividade da CDK5 com a indução de morte em células neuronais (Cheung & Ip, 2012; Dhavan & Tsai, 2001; Patrick *et al.*, 1999). Na doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson, estudos têm mostrado que a CDK5 é hiperativada pela p25 que desregula esta CDK e promove a neurodegeneração (Cheung & Ip, 2012; Patrick *et al.*, 1999; Nguyen & Julien, 2003; Lau & Ahlijanian, 2003; Smith *et al.*, 2003; Bu *et al.*, 2002). Inúmeros estudos que relacionam doenças neurodegenerativas com CDK5 mostram a relevância desta proteína quinase como alvo terapêutico (Rosales & Lee, 2006). Contudo, a CDK5 é a única das CDKs que para ser ativada, apesar das semelhanças com este grupo, necessita de proteínas não-ciclina (*cyclin-like*) e não exige fosforilação no seu sítio de ativação (Laloti *et al.*, 2010). Pensava-se que sua atividade quinase era limitada ao sistema nervoso, devido à expressão predominante de seus ativadores p35 e p39, ativadores restritos a membrana da célula (Rosales & Lee, 2006; Tanabe *et al.*, 2014). A figura 3 traz um exemplo de estrutura de CDK5 com foco no inibidor acoplado no bolsão de ligação de ATP.

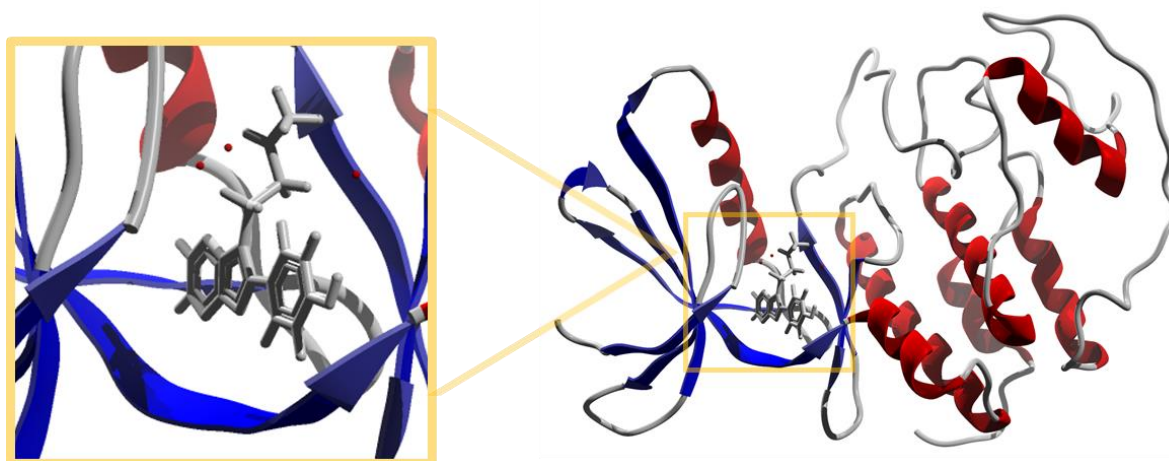


Figura 3. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK5) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 1UNG). O inibidor de CDK (6-phenyl[5h]pyrrolo[2,3-

b]pyrazine / Aloisine A (Sinônimo)) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. A imagem da proteína foi gerada utilizando MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 1UNG (Mapelli *et al.*, 2008).

A CDK6 (associada com ciclinas) também possui seu papel na regulação do ciclo celular, sendo considerada também um promissor alvo para o tratamento do câncer. Esta quinase é uma subunidade catalítica essencial para a progressão através da fase G1, através de associação e ativação com ciclinas do tipo D, promovendo a fosforilação de membros da família de proteínas do Retinoblastoma (p107, p130, pRB) (Obaya & Sedivy, 2002; Satyanarayana & Kaldis, 2009, Ho & Dowdy, 2002). A desregulação das atividades da CDK6 (associada a ciclina-D) resulta numa perda de controle entre os estímulos relacionados a mitose e a regulação do ciclo celular, o que leva a uma proliferação celular descontrolada (Ortega *et al.*, 2002). Uma amplificação do gene da CDK6 e o aumento de sua expressão têm sido descritos em linfomas, leucemias, carcinoma de células escamosas, gliomas e meduloblastoma (Corcoran *et al.*, 1999; Costello *et al.*, 1997; Mendrzyk *et al.*, 2005). A figura 4 traz um modelo de CDK6 dando ênfase no inibidor acoplado no bolsão de ligação de ATP.

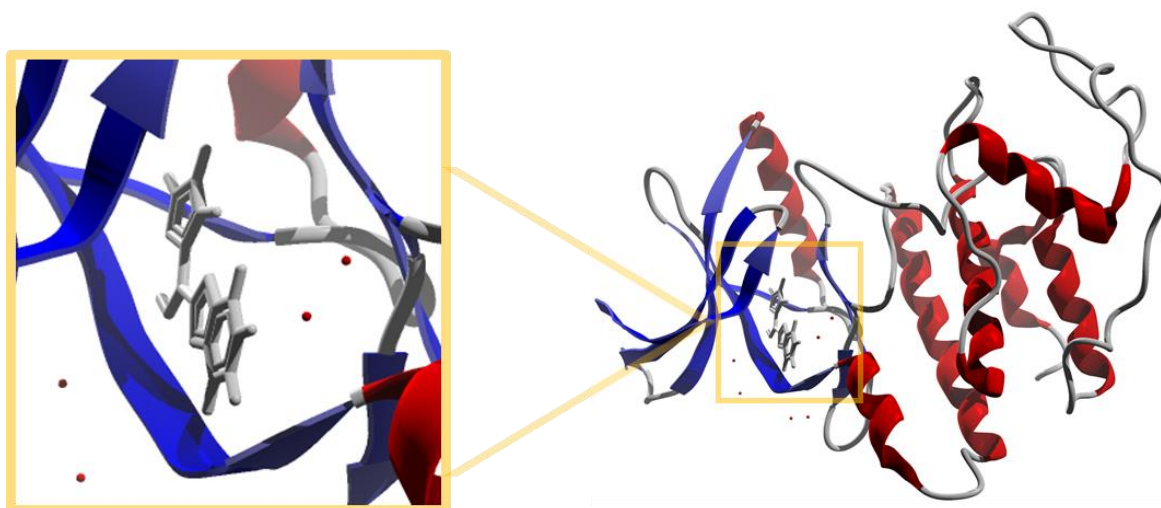


Figura 4. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK6) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 4AUA. O inibidor de CDK (1H-benzimidazol-2-yl(1H-pyrrol-2-yl)methanone) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. A imagem da proteína foi gerada utilizando MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 4AUA (Cho *et al.*, 2012).

A CDK8 é um componente do complexo Mediador, um complexo multiproteico evolutivamente conservado que atua como mediador entre o complexo de transcrição Pol II e quaisquer ativadores de transcrição localizados a montante, ou estimuladores que regulem a transcrição catalizada pela enzima Pol II. Além do seu papel na regulação da transcrição genica, tem sido apontado como um regulador de vários passos na progressão do ciclo celular (Szilagyí & Gustafsson, 2013). Esta CDK foi classificada como uma oncoproteína nos cânceres colorretal e gástrico, e outras evidências mostram o seu papel na promoção da proliferação celular em pacientes com melanoma e câncer de mama (Firestein et al., 2008; Firestein & Hahn, 2009; Xu & Ji, 2011; Xu et al., 2015). A figura 5 traz uma CDK8 com foco no inibidor acoplado no bolsão de ligação de ATP.

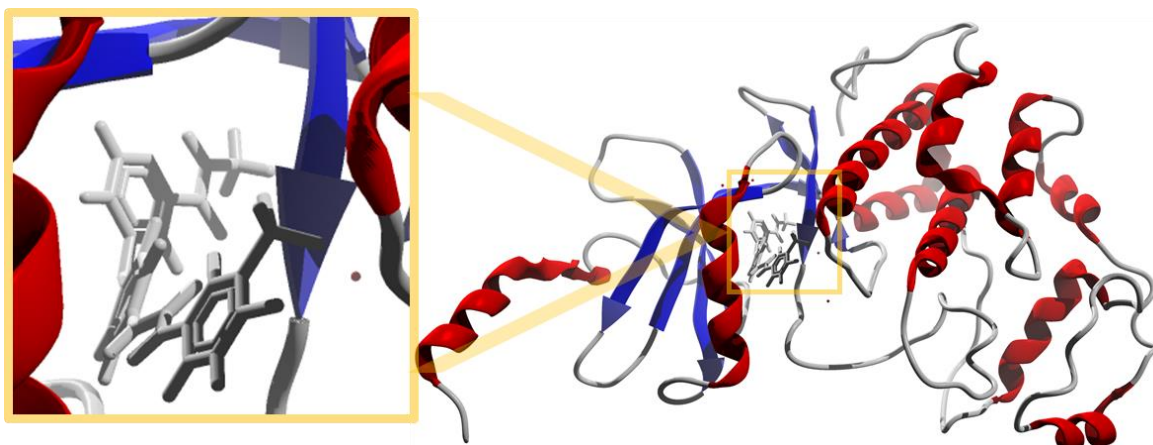


Figura 5. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK8) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 3RGF). O inibidor de CDK (4-{4-[[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]amino]carbonyl]amino]phenoxy}-n-methylpyridine-2-carboxamide / Sorafenib (Sinônimo)) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. A imagem da proteína foi gerada utilizando MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 3RGF (Schneider *et al.*, 2011).

Outra CDK com interesse farmacológico é a CDK9, que é componente do complexo de super alongação, fosforilando a RNA Pol II no domínio carboxi-terminal para promover a liberação da RNA Pol II e transcrição da alongação. As vias de sinalização da CDK9 que estão envolvidas no desenvolvimento de tumores e, ainda a atividade anormal da CDK9/T1, foram observadas em alguns tumores malignos humanos (Romano, 2013). Inibidores da CDK9 tem mostrado ser seletivamente

citotóxico para células cancerosas (quando comparado a células normais), sugerindo que esta CDK pode ser um alvo terapêutico bastante vantajoso (De Falco & Giordano, 2002; Nowicki & Walkinshaw, 2010; Polier *et al.*, 2011; Polier *et al.*, 2015). Isto se baseia no fato de células cancerosas geralmente dependerem da produção de proteínas reguladoras anti-apoptóticas de vida curta de modo a resistir a morte celular programada. A redução da transcrição destes fatores de sobrevivência através da inibição farmacológica da CDK9 resultaria em uma atividade anti-tumoral devido ao restabelecimento do processo de apoptose (morte celular programada) (Chen *et al.*, 2005). A figura 6 representa uma CDK9 com foco no inibidor acoplado no bolsão de ligação de ATP.

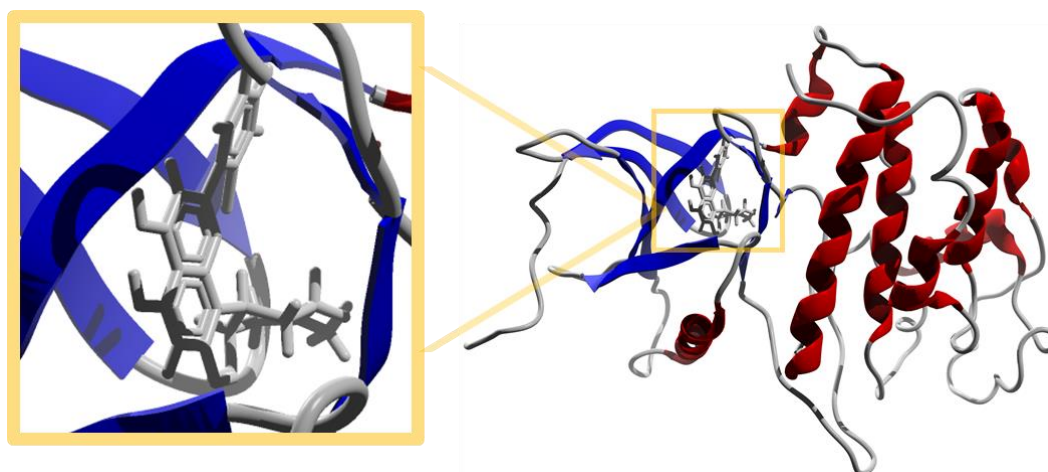


Figura 6. Estrutura bilobal típica da Quinase Dependente de Ciclina (CDK9) em complexo com o inibidor (código PDB de acesso: 3BLR). O inibidor de CDK (2-(2-chloro-phenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-hydroxy-1-methyl-piperidin-4-yl)-4h-benzopyran-4-one // FLAVOPIRIDOL (Sinônimo)) é mostrado no bolsão de ligação de ATP. A imagem da proteína foi gerada utilizando MVD (Thomsen & Christensen, 2006) e as coordenadas atômicas da estrutura 3BLR (Baumli *et al.*, 2008).

Tendo em vista que a desregulação desta família de proteínas pode acarretar em diversas doenças, inclusive o câncer, esses membros específicos das CDKs têm sido objeto de estudo como alvos terapêuticos para síntese de novos fármacos (Malumbres, 2014).

1.3 Estudo computacional (proteína-ligante)

Para que o desenvolvimento de novos fármacos ocorra de modo racional, deve ser baseado no estudo detalhado de estrutura tridimensional da proteína de

interesse, além de conhecer sua interação com o ligante. Esta análise é primordial para todo o processo de desenvolvimento e para que seja possível a otimização de um fármaco líder, que deverá possuir características de alta seletividade/especificidade adicionalmente a propriedades farmacocinéticas adequadas (Thomsen & Christensen, 2006).

Do ponto de vista da biologia de sistemas computacionais, as CDKs compreendem um sistema de interesse biomolecular para uma análise integrada da sua informação tridimensional e a informação de afinidade de ligação do ligante. Existem mais de 400 estruturas cristalográficas para as CDKs depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Westbrook *et al.*, 2003), em pesquisa feita em março de 2016. Como PDB permite filtrar as informações por afinidade de ligação, podemos combinar as informações tridimensionais com afinidade de ligação do ligante e construir um conjunto de dados com as estruturas determinadas experimentalmente para o qual os dados afinidade de ligação é conhecida. Este é um cenário favorável para a aplicação de abordagens de biologia de sistemas computacional, a fim de desenvolver um modelo matemático para prever a afinidade de ligação do ligando para a proteína alvo (Kitano, 2002).

A identificação de possíveis inibidores competitivos das CDKs, é realizada através de uma abordagem *in silico* por simulação de *docking* molecular. Entre os diversos algoritmos implementados em programas de *docking* molecular, o uso de computação bioinspirada tem mostrado sucesso (Thomsen & Christensen, 2006; Heberlé & De Azevedo, 2011; De Azevedo Jr., 2010).

A computação bioinspirada é uma abordagem de algoritmos que se inspira em modelos biológicos a fim de buscar a solução para problemas de otimização que não especificamente biológicos. Os principais modelos empregados na computação bioinspirada são: redes neurais (Wasserman, 1989), algoritmos genéticos (Koza *et.al.*, 1999) e algoritmos evolucionários (Layton, 2008). A simulação computacional da interação proteína-ligante é um problema de otimização que pode ser abordado empregando algoritmos evolucionários. A simulação da interação proteína-ligante, onde as coordenadas atômicas de cada ligante são obtidas computacionalmente é denominada simulação de *docking*. Nestas simulações o ligante pode ter uma estrutura flexível (com liberdade de girar seus ângulos de torção) ou não (sem liberdade de girar os ângulos de torção) (De Azevedo Jr. & Dias, 2008).

Para que as simulações de *docking* sejam aplicadas, é importante que o protocolo de *docking* seja testado. O primeiro passo deve ser o *re-docking*, que busca verificar se a estratégia de *docking* é capaz de recuperar uma estrutura cristalográfica. Este processo compara aquela estrutura obtida através da simulação de *docking* (denominada pose) com a posição do ligante, obtido através da estrutura cristalográfica que envolve proteína e ligante. Após as poses serem geradas, estas são comparadas com a posição do ligante da estrutura cristalográfica (ligante de referência). Esta comparação gera um Desvio Médio Quadrático (RMSD) que é calculado entre dois conjuntos de coordenadas atômicas: um para a estrutura cristalográfica (x_c, y_c, z_c) e outro para as coordenadas atômicas obtidas a partir das simulações de *docking* (x_d, y_d, z_d). A soma é tomada sobre todos os N átomos de ser comparados entre si (conforme equação descrita na metodologia). São considerados melhores resultados das simulações de *docking* aqueles valores de cálculo de RMSD que estiverem abaixo de 2.0 Å, quando comparado com estruturas cristalográficas (De Azevedo Jr., 2010; Heberlé & De Azevedo Jr., 2011).

Outro procedimento que deverá ser realizado, principalmente nos casos onde há várias estruturas cristalográficas disponíveis para a mesma proteína, é o *ensemble-docking*, que consiste em ligar um número de moléculas em uma variedade de estruturas cristalinas de uma proteína idêntica (Thilagavathi & Mancera, 2010).

Há diversos estudos de *docking* molecular que têm como foco as CDKs (Saranya & Selvaraj, 2011, Azevedo *et al.*, 2012; Haneef *et al.*, 2014; Jayaraman & Jamil, 2014; Putey *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015) no entanto, de nosso conhecimento, esta é a primeira vez que um grande desenvolvimento de simulação de *docking* proteína-ligante e função score foram realizados para as CDKs. Desta forma, propõe-se integrar os dados de afinidade e estruturais para construir funções escores polinomiais adaptadas (ao sistema) das CDKs. Adicionalmente utilizamos as funções escores padrões, como termos de uma equação polinomial e através de análise de regressão realizamos a construção de uma função score "personalizada" para as CDKs. Além disso, realizou-se uma abordagem de *docking* molecular integrada para investigar a correlação dos resultados de *docking* molecular com as funções escores.

2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que o número esperado de novos casos de câncer sofra um aumento de 70% nas próximas duas décadas, já figurando entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. Cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes que estão relacionadas ao câncer em 2012 (WHO, 2015).

Neste contexto, observa-se a importância da busca de novos potenciais inibidores seletivos de Quinases Dependentes de Ciclinas (CDKs), que são proteínas quinase serina-treonina que possuem seus níveis variando durante o ciclo celular para que este ocorra de modo controlado. (Ahmed & Sharma, 2011; Satyanarayana & Kaldis, 2009; Hochegger *et al* 2008). Todavia, uma desregulação desta família de proteínas, que pode levar a uma desregulação do ciclo celular, é uma característica importante de várias doenças, dentre elas o câncer – contribuindo para um crescimento e proliferação descontrolados de células. (Malumbres & Barbacid, 2009; Hanahan & Weinberg, 2000). O presente trabalho buscou identificar novos potenciais inibidores de Quinases Dependentes de Ciclinas (CDKs) empregando ferramentas de bioinformática, a partir da simulação computacional da interação de ligantes com o sítio ativo da enzima.

Vale ressaltar que critérios importantes de nossa proposta foram satisfeitos como: a) originalidade de nossa abordagem; b) aplicabilidade dos métodos aqui propostos; c) potencial de gerar novos conhecimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Identificar a melhor abordagem computacional para a busca de potenciais inibidores das CDKs.

3.2 *Objetivos específicos*

- Utilizar a base de dados *Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb) para selecionar estruturas cristalográficas de CDKs, para as quais há informação sobre a afinidade do inibidor pela enzima (aquisição de dados).

- Filtrar os dados estruturais das CDKs, de forma que a informação sobre a qualidade dos modelos estruturais possa ser avaliada.

- Minerar os dados estruturais das CDKs, de forma que se possa determinar valores mínimos e máximos de características estruturais disponíveis. Serão avaliados parâmetros estruturais, tais como: resolução cristalográfica, fator de vibração térmica, número de resíduos que faltam na estrutura, entre outros.

- Refinar a base de dados estruturais das CDKs, de forma que se possa separar os dados estruturais disponíveis (para eliminar redundâncias) por exemplo, entre os estruturais disponíveis, quais deles apresentam menor fator de vibração térmica para os ligantes.

- Testar diferentes protocolos de *docking* molecular para uma estrutura cristalográfica de CDK representativa (*re-docking*).

- Usar o protocolo de *docking* molecular identificado para as outras estruturas cristalográficas (*ensemble-docking*).

- Testar diferentes funções escore empíricas para avaliar a interação das CDKs com ligantes.

- Identificar as interações intermoleculares dos ligantes identificados na busca virtual.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions

Submetido e aceito pelo periódico: *Combinatorial Chemistry & High
Throughput Screening*

DOI: 10.2174/1386207319666160927111347

Disponível também através do PubMed:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27686428>

“MMX, GSH, MBA, NMBL, and VOP contributed equally to this work and should be considered first authors.”

RESEARCH ARTICLE

SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions

Mariana Morrone Xavier¹, Gabriela Sehnem Heck¹, Mauricio Boff de Avila^{1,2}, Nayara Maria Bernhardt Levin^{1,2}, Val Oliveira Pintro¹, Nathália Lemes Carvalho¹, Walter Filgueira de Azevedo Jr.*^{1,2}

¹Laboratory of Computational Systems Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil; ²Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Bioscience, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681. Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil

Abstract: Background: Docking allows to predict ligand binding to proteins, since the 3D-structure for the target is available. Several docking studies have been carried out to identify potential ligands for drug targets. Many of these studies resulted in the leads that were later developed as drugs.

Objective: Our goal here is to describe the development of an integrated computational tool to assess docking accuracy and build new scoring functions to predict ligand-binding affinity.

Method: We carried out docking simulations using MVD program for a data set available on CSAR 2014 database (coagulation factor Xa) for which ligand-binding information and structures are available. These docking results were analyzed using SAnDReS available at www.sandres.net. Machine learning methods were applied to build new scoring functions and our results were compared with previously published benchmarks.

Results: Our integrated docking strategy generated poses with docking accuracy higher than previously published benchmarks. In addition, the new scoring function developed using SAnDReS shows better performance than well-established scoring functions such the ones available in Autodock, Autodock-Vina, Gold, Glide, and MVD.

Conclusion: The big data generated during docking lacked an integrated computational tool for statistical analysis of the influence of structural parameters on docking and scoring function performance. Here we describe methods to evaluate docking results using SAnDReS, a computational environment for statistical analysis of docking results and development of scoring functions. We believe that SAnDReS is a computational tool with potential to improve accuracy in docking projects.

ARTICLE HISTORY

Received: June 4, 2016
Revised: August 31, 2016
Accepted: September 14, 2016

DOI: 10.2174/1386207319666160927111347



Keywords: Dock, protein, target, drug, machine learning.

1. INTRODUCTION

The data explosion in the number of macromolecules deposited in the Protein Data Bank (PDB) [1-3] opens the possibility to investigate the correlation of these experimentally determined structures with functional information. This is a favorable scenario for application of computational systems biology approaches [4]. Such approaches can be used to develop mathematical models to predict ligand-binding affinity for a target protein. It is also possible to use these three-dimensional structures to study

drug targets. The use of structural information makes possible to apply virtual screening (VS) methodology to identify novel hits and guide future development of new drugs. The main method to investigate potential new hits for a target protein is the procedure of protein-ligand docking simulations [5-11].

Protein-ligand docking simulations employ scoring functions to evaluate ligand-binding energy [10]. For validation of scoring functions, it is common to investigate the correlation between the experimental binding affinity with scoring functions. This statistical analysis can be based on squared Pearson's (R^2) or Spearman's (ρ) correlation coefficients [12]. Analysis of scoring function performance can also be carried out using data sets with active and decoy ligands, as proposed in the directory of useful decoys, enhanced (DUD-E) [13].

*Address correspondence to this author at the Faculty of Biosciences - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil; Tel/Fax: ++55-51-3353-4529; E-mails: walter.junior@pucrs.br, walter@azevedolab.net
MMX, GSH, MBA, NMBL, and VOP contributed equally to this work and should be considered first authors.

**Towards a Specific Scoring Function for Cyclin-Dependent Kinases.
A Machine Learning Approach Based on Crystallographic Information**

Submetido ao periódico: Current Medicinal Chemistry

Towards a Specific Scoring Function for Cyclin-Dependent Kinases. A Machine Learning Approach Based on Crystallographic Information

Nayara Maria Bernhardt Levin^{a,b}, Val Oliveira Pinto^a, and Walter Filgueira de Azevedo Jr^{*a,b}

^a *Laboratory of Computational Systems Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brazil;* ^b *Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brazil*

Abstract: Cyclin-dependent kinases (CDKs) comprise an interesting biological system for studying protein-ligand interactions due to the abundance of crystallographic structures of complexed structures for which ligand binding affinity is known. Here, we describe an integrated molecular docking protocol applied to an ensemble of crystallographic structures of CDKs for which experimental information about half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) is available. This integrated computational approach was tested against a dataset composed of 176 crystallographic structures of CDK in complex with small-molecule inhibitors. To our knowledge, this is the largest dataset of CDK crystallographic structures submitted to molecular docking simulation and development of scoring function. An integrated analysis of experimental binding affinity and crystallographic structures was employed to build a polynomial scoring function tailored to CDKs. We applied supervised machine learning techniques for the development of this computational model. Our results indicated that the proposed integrated strategy for docking against CDKs generated poses with docking root-mean square deviation (RMSD) below 2.0 Å for most of the structures in the dataset. In addition, analysis of enrichment factors and correlation coefficient of the proposed polynomial scoring function for CDKs was able to predict binding affinity with better performance when compared with previously reported benchmarks for CDKs.

Keywords: Cyclin-dependent kinase; drug design; scoring function; machine learning; crystallography

1. INTRODUCTION

Cyclin-dependent kinase (Enzyme Classification (EC) 2.7.11.22) (CDK) has been extensively examined as a target protein for drug development, mainly because its role in controlling cell-cycle progression. In eukaryotic cells, CDK1-4 and 6 are responsible for check points which allow safely progress of cell cycle when these enzymes are fully active [1, 2]. More recently, a CDK4/6 inhibitor (Palbociclic, Pfizer) has reached the market as an anticancer drug, which further validate the importance of CDK inhibitors in the development of a new generation of drugs against cancer [3].

In addition, from the computational systems biology view, CDK comprises an interesting biomolecular system for an integrated analysis of three-dimensional information and ligand-binding affinity. There are over 400 crystallographic structures for CDK deposited in the Protein Data Bank (PDB) (search carried out on November 2nd 2016) [4-6]. Combining crystallographic information with ligand binding affinity allows us to build a dataset of structures to be used to train supervised machine learning (SML) models. This is a promising scenario for application of computational systems biology approaches [7], in order to develop a mathematical model to predict ligand-binding affinity for this target protein.

*Address correspondence to this author at the Laboratory of Computational Systems Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil, 90619-900; Tel/Fax: ++55-51-3353-4529; E-mails: walter@azevedolab.net, walter.junior@pucrs.br

Crystallographic structure of CDK was first determined in 1993 [8]. Fig. (1) illustrates the typical CDK structure, a bilobal structure with N-terminal composed of a distorted beta sheet and the C-terminal made preponderantly of alpha helices. The ATP-binding pocket is located in between both terminals.

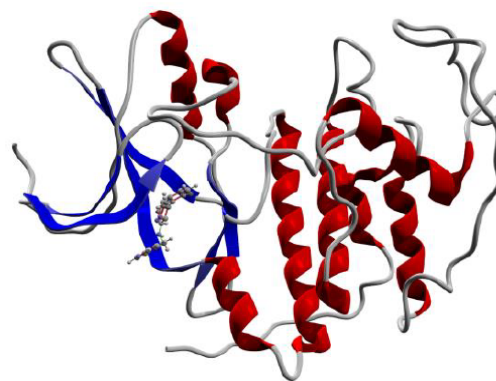


Fig. (1). Typical bilobal structure of human CDK2. Ball and stick model of a CDK inhibitor (5-(2-fluorophenyl)-N-(pyridin-4-ylmethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amine) is shown in the ATP-binding pocket.

Analysis of the crystallographic structures of complexes between CDKs and small-molecule inhibitors highlighted some structural aspects that have been used to guide the computed-aided design of more specific CDK inhibitors,

**Understanding the Structural Basis for Inhibition of Cyclin-Dependent
Kinases. New Pieces in the Molecular Puzzle**

Submetido ao periódico: Current Drug Targets

Understanding the Structural Basis for Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases. New Pieces in the Molecular Puzzle

Nayara M. Bernhardt Levin^{a,b}, Val Oliveira Pinto^a, Maurício Boff de Ávila^{a,b}, Bruna Boldrini de Mattos^a and Walter Filgueira de Azevedo Jr.^{*a,b}

^aLaboratory of Computational Systems Biology, Faculty of Biosciences - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil.; ^bGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biosciences - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681. Porto Alegre-RS 90619-900, Brazil.



Abstract: Background. Cyclin-dependent kinases (CDKs) comprise an important protein family for development of drugs, mostly aimed for use in treatment of cancer but there is also potential for development of drugs for neurodegenerative diseases and diabetes. Since the early 1990s, structural studies have been carried out on CDKs, in order to determine the structural basis for inhibition of this protein target.

Objective. Our goal here is to review recent structural studies focused on CDKs. We concentrate on latest developments in the understanding of the structural basis for inhibition of CDKs, relating structures and ligand-binding information.

Method. Protein crystallography has been successfully applied to elucidate over 400 CDK structures. Most of these structures are complexed with inhibitors. We use this richness of structural information to describe the major structural features determining the inhibition of this enzyme.

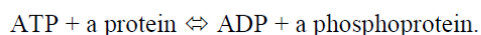
Results. Structures of CDK1, 2, 4-9, 12 and 13 have been elucidated. Analysis of these structures in complex with a wide range of different competitive inhibitors, strongly indicate some common features that can be used to guide the development of CDK inhibitors, such as a pattern of hydrogen bonding and the presence of halogen atoms in the ligand structure.

Conclusion. Nowadays we have structural information for hundreds of CDKs. Taken the structural and functional data together, we may say that a pattern of intermolecular hydrogen bonds is of pivotal importance for inhibitor specificity. In addition, machine learning techniques have shown improvements in predicting binding affinity for CDKs.

Keywords: Cyclin-dependent kinase, binding affinity, drug design, machine learning.

1. INTRODUCTION

Several protein kinases (enzyme classification (EC) 2.7.-.-) have been described as participating in intracellular regulatory pathways (reviews in [1-10]). Our focus in this paper is on cyclin-dependent kinases (CDKs) (EC 2.7.11.22). We could say that, from the enzymology point of view, CDKs are enzymes that catalyze the phosphor transfer to a protein, as indicated in the catalyzed reaction below,



CDKs are also known as serine-threonine kinases, due to the specificity of their substrates.

Functional studies were able to determine the significance of CDKs in the cell cycle progression. Moreover, it has been found that CDKs are inactive as monomers. They need a protein partner to be fully activated, the cyclin protein for most of the CDKs except for CDK5 [11, 12]. The level of expression of these proteins oscillate during cell cycle progression, this fluctuation during cell cycle lent these proteins their cyclin name. As functional

studies progressed, new CDKs were identified and their biological roles established [13,14].

Because of the importance of CDKs in the regulation of the cell division cycle, these enzymes have been the object of extensive investigation. Furthermore, due to their central role in cell cycle progression, CDKs have caught attention as a target for development of anticancer drugs. Screening studies aimed to identify CDK inhibitors were initially focused on starfish due to the abundance of CDK1/cyclin D in starfish oocytes [15], which allowed the identification of roscovitine, a CDK inhibitor with IC_{50} in nanomolar range [16, 17].

In parallel with CDK functional studies, several research groups tried to obtain x-ray diffracting crystals to determine the three-dimensional structure of CDK. The elucidation of the three-dimensional structures of CDK2 by means of x-ray diffraction crystallography paved the way for application of bioinformatics and cheminformatics approaches to search for potential CDK inhibitors. One of the most successful inhibitors identified so far is palbociclib, which is currently in phase III of clinical trials with FDA approval [18-21]. Palbociclib is a CDK inhibitor for the treatment of breast

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando inicialmente as análises de resultados de pré-*docking* e re-*docking* para o conjunto de estudo, SAnDReS (utilizando como um critério de seleção a resolução de raios x) identificou o código PDB 2R3I (Fischmann *et al.*, 2008) como a estrutura com mais alta resolução do conjunto de dados de CDK. Esta foi a estrutura cristalográfica utilizada nas simulações de re-*docking*, para realização dos 32 protocolos de *docking* propostos, onde o protocolo 13 obteve o maior coeficiente de correlação de Spearman (variou de -0,261 a 0,941) e um RMSD < 2,0 Å. A maior correlação foi observada para as funções escore de *Interaction* e *Protein*, indicando uma forte correlação entre essas funções escore e RMSD de *docking*, com *p-value* < 0,001 para ambas as funções. Além disso, foi possível observar que, através da análise dos gráficos de dispersão, os valores para a menor função escore apresentam um RMSD de *docking* abaixo de 2,0 Å (0,809 Å para ambas as funções escore). O melhor protocolo identificado foi empregado para realizar simulações de *docking* para o restante dos códigos PDBs no conjunto de estruturas cristalográficas (*ensemble docking*) e também para uma simulação de *virtual screening* focada em um conjunto de dados composto de *decoys* e ativos.

Foi realizada a análise da correlação dos resultados do *ensemble-docking* (RMSD) com funções escore, onde o coeficiente de correlação de Spearman variou de -0,164 a 0,400. Os maiores coeficientes de correlação ($\rho = 0,400$ e $p\text{-value}1 = 3,795 \cdot 10^{-8}$, $R^2 = 0,014$ e $p\text{-value}2 = 1,123 \cdot 10^{-1}$) foram obtidos para *Displaced Water Score*. Para *Displaced Water Score* o RMSD para o menor valor da função escore é 0,145 Å. A análise dos resultados do *ensemble docking* para *Displaced Water Score* indicou que mais de 50% dos RMSDs de *docking* tiveram valor < 2,0 Å, demonstrando a precisão desta função para simulações de *docking* molecular para o conjunto de dados de CDKs.

Os resultados para o coeficiente de correlação entre as funções escore e $\log(IC_{50})$, para o conjunto de dados de CDKs, foi obtida a correlação mais significativa para *Re-rank Score* ($\rho = -0,214$ and $p\text{-value} = 0,00431$). No entanto, também foram observados valores de $p < 0,05$ para os scores *Internal* e *Electro Long*. A análise da correlação de R (R^2) gerou resultados pobres, com $R^2 < 0,1$ para todas as funções escore.

Com a finalidade de investigar funções adicionais para prever a afinidade de ligação, foi aplicada a metodologia função escore polinomial e implementada no programa SAnDReS para o conjunto de dados de CDKs. Ao fazê-lo, torna-se possível testar diferentes esquemas de escore, utilizando equações polinomiais onde seus termos são tomados a partir de funções escore originais geradas pelo programa de *docking* molecular. Neste trabalho, consideramos uma equação polinomial envolvendo os *Re-rank score*, *Internal score* e *Electro long score*, uma vez que estes de *scores* geraram valores de *p-value* mais baixos para o conjunto de dados em estudo. Foram gerados um total de 511 novas funções de escore polinomiais utilizando SAnDReS – as dez melhores equações foram evidenciadas no artigo submetido. O melhor resultado foi obtido para a equação polinomial 482 com $\rho = 0,39$ (valor- $p < 0,001$) para o conjunto treino (122 estruturas) e para o conjunto teste $\rho = 0,346$ ($p = 0,0104$) com 54 estruturas. A equação polinomial 482 utiliza as funções escore *Re-rank*, *Internal*, *Electro Long*, *Rerank.Internal* e *Interna²* como variáveis independentes. Estas funções escores polinomiais podem ser utilizadas como uma forma de explorar um espaço virtual composto por funções escores, onde pode ser encontrada a função mais adequada para o sistema que se deseja simular.

Para testar a capacidade das equações polinomiais em prever *decoys* e ligantes ativos, foi construído um conjunto de dados com ligantes identificados nas 176 estruturas complexas do conjunto de dados de CDKs como agentes ativos e, foram adicionados 1584 ligantes *decoys*. Estes falsos ligantes (*decoys*) foram selecionados aleatoriamente a partir de base de dados *DUD-E* para gerar um conjunto de dados com ativos e *decoys*. Foi realizada uma simulação *virtual screening*, utilizando o protocolo 13 voltado para a estrutura da proteína 2R3I (Fischmann et al., 2008), como anteriormente descrito. Os resultados mostraram que a equação polinomial 482 possui um desempenho geral melhor quando comparados com as funções escore originais. Além disso, esta equação mostra um desempenho melhor quando comparada a resultados previamente publicados de *docking* para as CDKs (EF1 = 13,9, EF20 = 1,4) (Huang et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho apresentou a aplicação de uma metodologia flexível e moderna de *docking* proteína-ligante para um conjunto de 176 estruturas de CDKs. De nosso conhecimento, este é o maior conjunto de dados já utilizado para estudos de *docking* focado em CDKs. Foram testados um total de 32 protocolos de *docking* e avaliou-se a precisão encaixe e a correlação entre as funções escore e RMSD de *docking* empregando-se uma ferramenta gráfica integrada implementada no programa SAnDReS. A análise dos resultados de *docking* indicam um RMSD de *docking* abaixo de 2,0 Å para a maioria das estruturas no conjunto de dados CDK, o que indica fortemente a precisão dos resultados de *docking* obtidos utilizando o programa MVD. A aplicação do programa SAnDReS para as funções escore determinadas para o conjunto de dados de CDKs foi capaz de construir uma nova função escore polinomial para prever a afinidade de ligação com melhor desempenho do que as funções escore bem estabelecidos disponíveis no MVD. Além disso, empregou-se o SAnDReS para construir um conjunto de dados com *decoys* e ligantes ativos que testou-se uma simulação VS. Classificou-se os resultados VS utilizando funções polinomiais que geraram Fatores de Enriquecimento de escore melhores do que os obtidos a partir de estudos de referência publicados anteriormente (Huang et al., 2006). A partir destes resultados podemos dizer que a metodologia aqui descrita abriu a possibilidade de melhorar a precisão dos estudos de *docking* focados em CDKs e, além disso, estabeleceu uma metodologia integrada que permite a construção de funções escore sob medida para o sistema biológico a ser simulado.

7 REFERÊNCIAS

- Abdullah, C.; Wang, X.; Becker, D. Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma. *Cell Cycle*. 2011;10(6):977–88.
- Ahmed, D., Sharma, M. Cyclin-Dependent Kinase 5/p35/p39: a novel and imminent therapeutic target for diabetes mellitus. *Int J Endocrinol*. 2011; 2011:530274.
- Azevedo, L.S., Moraes, F.P., Xavier, M.M., Pantoja, E.O., Villavicencio, B., Finck, J.A., Proenca, A.M., Rocha, K.B., de Azevedo W.F. Jr. Recent Progress of Molecular Docking Simulations Applied to Development of Drugs. *Curr. Bioinform*. 2012, 7, 352-365.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E.D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A.N., Debreczeni, J.E., Knapp, S., Johnson, L.N. The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *Embo J*. 2008;27: 1907-1918.
- Bu, B.; Li, J., Davies, P., Vincent, I. Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J. Neurosci*. 2002;22(15):6515–25.
- Cavasotto, C.N., Abagyan, R.A. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. *J. Mol. Biol*. 2004, 337, 209-225.
- Chen. R., Keating, M.J., Gandhi, V., Plunkett, W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 2005;106(7): 2513–9.
- Cheung, Z.H., Ip, NY. Cdk5: A multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*. 2012;22(3):169–75.
- Cho, Y.S., Angove, H., Brain, C., Chen, C.H.T., Cheng, R., Chopra, R., Chung, K., Congreve, M., Dagostin, C., Davis, D., Feltell, R., Giraldez, J., Hiscock, S., Kim, S., Kovats, S., Lagu, B., Lewry, K., Loo, A., Lu, Y., Luzzio, M., Maniara, W., Mcmenamin, R., Mortenson, P., Benning, R., Oreilly, M., Rees, D., Shen, J., Smith, T., Wang, Y., Williams, G., Woolford, A., Wrona, W., Xu, M., Yang, F., Howard, S. Fragment-Based Discovery of 7-Azabenzimidazoles as Potent, Highly Selective and Orally Active Cdk4/6 Inhibitors. *Acs Med.Chem.Lett*. 2012;3: 445.
- Corcoran, M.M., Mould, S.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Chapman, R.M., Boright, A.P., Platt, C., Tsui, L.C., Scherer, S.W., Oscier, D.G. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. *Oncogene* 1999, 18, 6271–6277.
- Costello, J.F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V.M., Held, W.A., Berger, M.S., Huang, H-J.S., Cavenee, W.K. Cyclin-dependent Kinase 6 (CDK6) Amplification in Human Gliomas Identified Using Two-dimensional Separation of Genomic DNA. *Cancer Res*. 1997, 57, 1250–1254.

- De Azevedo, W.F. Jr., Canduri F, da Silveira NJ. Structural basis for inhibition of cyclin-dependent kinase 9 by flavopiridol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293, 566-571.
- De Azevedo, W.F. Jr., Dias R. Evaluation of ligand-binding affinity using polynomial empirical scoring functions. *Bioorg Med Chem* 2008;16(20):9378-82.
- De Azevedo, W.F. Jr. MolDock applied to structure-based virtual screening. *Curr Drug Targets.* 2010;11(3):327–34.
- De Azevedo, W.F. Jr. Opinion Paper: Targeting Multiple Cyclin-Dependent Kinases (CDKs): A New Strategy for Molecular Docking Studies. *Curr. Drug Targets* 2016;17, 2-2.
- De Falco, G., Giordano, A. CDK9: from basal transcription to cancer and AIDS. *Cancer Biol Ther.* 2002;1(4):342-7.
- DeBodt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim S- H. Crystal Structure of Cyclin-Dependent Kinase 2. *Nature* 1993, 363, 595-602.
- Dhariwala, F.A., Rajadhyaksha, M.S. An unusual member of the Cdk family: Cdk5. *Cell Mol Neurobiol.* 2008;28(3):351-69.
- Dhavan, R., Tsai, L.H. A decade of CDK5. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(10):749–59.
- Ekberg, J., Holm, C., Jalili, S., Richter, J., Anagnostaki, L., Landberg, G., Persson, J.L. Expression of cyclin A1 and cell cycle proteins in hematopoietic cells and acute myeloid leukemia and links to patient outcome. *Eur. J. Haematol.* 2005;75(2):106–15.
- Firestein, R., Bass, A.J., Kim, S.Y., Dunn, I.F., Silver, S.J., Guney, I., Freed, E., Ligon, A.H., Vena, N., Ogino, S. et al. CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates beta-catenin activity. *Nature* 2008, 455, 547–551.
- Firestein, R., Hahn, W.C. Revving the Throttle on an Oncogene: CDK8 Takes the Driver Seat. *Cancer Res.* 2009, 69, 7899–7901.
- Fischmann, T.O., Hruza, A.W., Madison, V.M., Duca, J.S. Structure-guided discovery of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biopolymers.* 2008;89: 372-379
- Georgieva, J., Singha, P., Schadendorf, D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J. Clin. Pathol.* 2001;54(3):229–35.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
- Haneef, M., Lohani, M., Dhasmana, A., Jamal, Q.M., Shahid, S.M., Firdaus, S. Molecular Docking of Known Carcinogen 4- (Methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with Cyclin Dependent Kinases towards Its Potential Role in Cell Cycle Perturbation. *Bioinformation* 2014, 10, 526-532.

- Heberlé, G., De Azevedo, W.F. Jr. Bio-Inspired Algorithms Applied to Molecular Docking Simulations. *Curr Med Chem.* 2011;18(9):1339-52.
- Ho, A., Dowdy, S.F. Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002, 12, 47–52.
- Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(11):910-16.
- Huang, N., Shoichet, B.K., Irwin, J.J. Benchmarking sets for molecular docking. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 6789-6801.
- Husdal, A., Bukholm, G., Bukholm, I.R.K. The prognostic value and overexpression of cyclin A is correlated with gene amplification of both cyclin A and cyclin E in breast cancer patient. *Cell. Oncol.* 2006;28(3):107–16.
- Jayaraman, A., Jamil, K. Drug targets for cell cycle dysregulators in leukemogenesis: in silico docking studies. *PLoS One* 2014, 9, e86310.
- Karst, A.M., Jones, P.M., Vena, N., Ligon, A.H., Liu, J.F., Hirsch, M.S., Etemadmoghadam, D., Bowtell, D.D.L., Drapkin, R. Cyclin E1 deregulation occurs early in secretory cell transformation to promote formation of fallopian tube derived high-grade serous ovarian cancers. *Cancer Res.* 2013;74(4):1141–52.
- Kitano, H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002, 295, 1662-1664.
- Koutsami, M.K., Tsantoulis, P.K., Kouloukoussa, M., Apostolopoulou, K., Pateras, I.S., Spartinou, Z., Drougou, A., Evangelou, K., Kittas, C., Bartkova, J., *et al.* Centrosome abnormalities are frequently observed in non-small-cell lung cancer and are associated with aneuploidy and cyclin E overexpression. *J. Pathol.* 2006;209(4):512–21.
- Koza, J.R., Bennet, D., Keane, M. Genetic programming III: Darwinian invention and problem solving. 1999; NewYork: Morgan Kaufmann Publishers.
- Lalioi, V., Pulido, D., Sandoval, I.V. Cdk5, the multifunctional surveyor. *Cell Cycle.* 2010;9(2):284-311.
- Lau, L.-F., Ahlijanian, M.K. Role of cdk5 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 2003;12(4-5):209–14.
- Layton, B. Recent patents in bionanotechnologies: nanolithography, bionanocomposites, cellbased computing and entropy production. *Recent Pat Nanotechnol.* 2008; 2(2):72-83.
- Liu, J.-L., Ma, H.-P., Lu, X.-L., Sun, S.-H., Guo, X., Li, F.-C. NF- κ B induces abnormal centrosome amplification by upregulation of CDK2 in laryngeal squamous cell cancer. *Int. J. Oncol.* 2011;39(4):915–24.
- Lockwood, W.W., Stack, D., Morris, T., Grehan, D., O'Keane, C., Stewart, G.L., Cumiskey, J., Lam, W.L., Squire, J.A., Thomas, D.M., *et al.* Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma. *J. Mol. Diagn.* 2011;13(3):289–96.

- Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 2014;15(6):122.
- Malumbres, M., Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer.* 2009;9(3):153-66.
- Mapelli, M., Massimiliano, L., Crovace, C., Seeliger, M.A., Tsai, L.-H., Meijer, L., Musacchio, A. Mechanism of Cdk5/P25 Binding by Cdk Inhibitors. *J.Med.Chem.* 2005;48: 671.
- Mendrzyk, F., Radlwimmer, B., Joos S., Kokocinski, F., Benner A., Stange, D.E., Neben, K., Fiegler, H., Carter NP., Reifemberger, G., et al. Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 8853–8862.
- Morgan, D.O. Principles of CDK Regulation. *Nature* 1995;374(6518):131-4.
- Morgan D.O. *The Cell Cycle; Principles of Control (Primers in Biology)*. London: New Science Press 2007:297. ISBN: 978-0-9539181-2-6.
- Murray, A.W. Cyclin-dependent kinases: regulators of the cell cycle and more. *Chem Biol* 1994; 1: 191-5.
- Nakayama, N., Nakayama, K., Shamima, Y., Ishikawa, M., Katagiri, A., Iida, K., Miyazaki, K. Gene amplification CCNE1 is related to poor survival and potential therapeutic target in ovarian cancer. *Cancer.* 2010;116(11):2621-34.
- Nar, A., Ozen, O., Tutuncu, N.B., Demirhan, B. Cyclin A and cyclin B1 overexpression in differentiated thyroid carcinoma. *Med. Oncol.* 2012;29(1):294–300.
- Nguyen, M.D., Julien, J.-P. Cyclin-dependent kinase 5 in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosignals.* 2003;12(4-5):215–20.
- Norbury, C., Nurse, P. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.* 1992;61:441-70.
- Nowicki, M.W., Walkinshaw, M.D. CDK9 inhibitors push cancer cells over the edge. *Chem Biol.* 2010;17(10):1047-8.
- Obaya, A.J., Sedivy, J.M. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59, 126–142.
- Ortega, S., Malumbres, M., Barbacid, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1602, 73–87.
- Patrick, G.N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P., Tsai, L.H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature.* 1999;402(6762):615–22.
- Pitchuanom, S., Boonyarat, C., Forli, S., Olson, A.J., Yenjai, C. Cyclin-dependent kinases 5 template: useful for virtual screening. *Comput Biol Med.* 2012;42(1):106–11.

Polier, G., Ding, J., Konkimalla, B.V., Eick, D., Ribeiro, N., Köhler, R., Giaisi, M., Efferth, T., Desaubry, L., Krammer, P.H., Li-Weber, M. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. *Cell Death Dis.* 2011;2:e182.

Polier, G., Giaisi, M., Köhler, R., Müller, W.W., Lutz, C., Buss, E.C., Krammer, P.H., Li-Weber, M. Targeting CDK9 by wogonin and related natural flavones potentiates the anti-cancer efficacy of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263. *Int J Cancer.* 2015;136(3):688-98.

Putey, A., Fournetm G., Lozach, O., Perrin, L., Meijer, L., Joseph, B. Synthesis and biological evaluation of tetrahydro[1,4]diazepino[1,2-a]indol-1-ones as cyclin-dependent kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, 83,617-629.

Romano, G. Deregulations in the cyclin-dependent kinase-9-related pathway in cancer: Implications for drug discovery and development. *ISRN Oncol.* 2013;2013:305371.

Rosales, J.L., Lee, K.-Y. Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *Bioessays* 2006;28(10):1023–34.

Santala, S., Talvensaaari-Mattila, A., Soini, Y., Honkavuori-Toivola, M., Santala, M. High expression of cyclin A is associated with poor prognosis in endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Tumor Biol.* 2014;35(6):5395–9.

Saranya, N., Selvaraj, S. Role of interactions and volume variation in discriminating active and inactive forms of cyclin-dependent kinase-2 inhibitor complexes. *Chem. Biol. Drug Des.* 2011,78, 361-369.

Satyanarayana, A., Kaldis, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene.* 2009;28(33):2925-39.

Schneider, E.V., Bottcher, J., Blaesse, M., Neumann, L., Huber, R., Maskos, K. The Structure of CDK8/CycC Implicates Specificity in the CDK/Cyclin Family and Reveals Interaction with a Deep Pocket Binder. *J.Mol.Biol.* 2011;412: 251-266.

Shewchuk, L., Hassell, A., Wisely, B., Rocque, W., Holmes, W., Veal, J., Kuyper, L.F. Binding mode of the 4-anilinoquinazoline class of protein kinase inhibitor: X-ray crystallographic studies of 4-anilinoquinazolines bound to cyclin-dependent kinase 2 and p38 kinase. *J.Med.Chem.* 2000;43: 133-138.

Smith, P.D., Crocker, S.J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K.L., Hayley, S., Mount, M.P., O'Hare, M.J., Callaghan, S, Slack, R.S., Przedborski, S., et al. Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100(23):13650–5.

Szilagyi. Z., Gustafsson, C.M. Emerging roles of Cdk8 in cell cycle control. *Biochim. Biophys. Acta* 2013, 1829, 916–920.

- Tanabe, K., Yamazaki, H., Inaguma, Y., Asada, A., Kimura, T., Takahashi, J., et al. Phosphorylation of debrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. *PLoS One*. 2014;9(3):e92291
- Thilagavathi, R., Mancera, R.L. Ligand-protein cross-docking with water molecules. *J. Chem. Inf. Model*. 2010;50(3):415-21.
- Thomsen, R., Christensen, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem*. 2006;49(11):3315-21.
- Wasserman P.D. *Neural computing: theory and practice*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989.
- Weroha, S.J., Lingle, W.L., Hong, Y., Li, S.A., Li, J.J. Specific overexpression of cyclin E-CDK2 in early preinvasive and primary breast tumors in female ACI rats induced by estrogen. *Horm. Cancer*. 2010;1(1):34–43.
- Westbrook, J., Feng, Z., Chen, L., Yang, H., Berman, H.M. The Protein Data Bank and structural genomics. *Nucleic Acids Res*. 2003, 31, 489-491.
- World Health Organization (2015) WHO Report. Geneva. Switzerland. Cancer. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acessado 05 Setembro 2016.
- Xu, W., Ji J-Y. Dysregulation of CDK8 and Cyclin C in tumorigenesis. *J. Genet. Genomics* 2011, 38, 439–452.
- Xu, W., Wang, Z., Zhang, W., Qian, K., Li, H., Kong, D., Li Y., Tang, Y. Mutated K-ras activates CDK8 to stimulate the epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic cancer in part via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cancer Lett*. 2015, 356, 613–627.
- Yan, L., Lai, L., Chen, X., Xiao, Z. Discovery of novel indirubin-3'-monoxime derivatives as potent inhibitors against CDK2 and CDK9. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2015, 25, 2447-2451.
- Zheng, J., Kong, H., Wilson, J.M., Guo, J., Chang, Y., Yang, M., Xiao, G., Sun, P. Insight into the interactions between novel isoquinolin-1,3-dione derivatives and cyclin-dependent kinase 4 combining QSAR and molecular docking. *PLoS One* 2014, 9, e93704.

8 ANEXOS

**Assunto: Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening:
Manuscript Acceptance letter – Email com a Confirmação de Aceite do
artigo**

Reference#: BSP-CCHTS-2016-553

Submission Title: SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions

Dear Dr. Walter F. Azevedo Jr.,

I am pleased to inform you that your article entitled SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions has been accepted for publication in "Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening" after independent peer review.

You may wish to request your Librarian to subscribe to the journal so that your work gets maximum exposure among your colleagues, researchers and readers in the field. I am pleased to bring to your attention a special limited time offer in this connection: If your Librarian decides to subscribe to the Bentham journal, you will become eligible to an optional offer which will allow free Open Access to this article as well as any other articles that you submit and which are accepted after peer review during the next 2 years.

We are also pleased to offer your institutions/library a FREE three months on-line trial of all Bentham Science Journals at no obligation to subscribe thereafter. The journals trial would allow free access to all the members of your institution/Library. For an on-line trial request, please click here (<http://benthamscience.com/free-online-trials-request-main.php>). If you are interested in this special limited time offer then you or your Librarian may contact either the Subscription Department directly at

<subscriptions@benthamscience.org> Bentham Science or alternatively orders may be placed via your librarian's journal acquisition agency.

You will be pleased to know that Bentham Science Publishers has collaborated with Kudos to increase the portfolio of its services for Bentham authors. Kudos is among the preferred media for the researchers. It is a web-based service that helps researchers to maximize the visibility, usage of and citations to your published articles (www.growkudos.com) Kudos will be contacting you to register to use this new service, that they are offering to a selected group of authors to help increase the readership and citations of their articles.

We wish to thank you for submission of the manuscript to Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening and look forward to a continued collaboration in the future.

With warm regards,

Editorial Office

Bentham Science Publishers

Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening

<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CCHTS>

**Assunto: Current Medicinal Chemistry: Email com a Confirmação de
Submissão (8 de novembro de 2016 16:06)**

Reference#: BSP-CMC-2016-1314

Submission Title: Towards a Specific Scoring Function for Cyclin-Dependent Kinases. A Machine Learning Approach Based on Crystallographic Information

Dear Dr. Walter F De AZEVEDO Jr.,

Thank you for your submission to Current Medicinal Chemistry. It will be sent to the Editor in Chief for his approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses CrossCheck's iThenticate software to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's Ethical Guidelines for Publication, all manuscripts are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <http://benthamscience.com/journal/publishing-ethics.php?journalID=cmc#top>.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name: Atta Rahman

Affiliation: Kings College, University of Cambridge, Cambridge

Country: United Kingdom

Email:cmc@benthamscience.org

Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write
info@benthamscience.org<mailto:info@benthamscience.org>

Sincerely,

Editorial Office

Bentham Science Publishers

Current Medicinal Chemistry

<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CMC>

**Assunto: Current Drug Targets: Email com a Confirmação de Submissão
(26 de agosto de 2016 03:30)**

Reference#: BSP-CDT-2016-651

Submission Title: Understanding the Structural Basis for Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases. New Pieces in the Molecular Puzzle

Dear Dr. Walter F De AZEVEDO Jr.,

Thank you for your submission to Current Drug Targets. It will be sent to the Editor in Chief for his approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses CrossCheck's iThenticate software to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's Ethical Guidelines for Publication, all manuscripts are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <http://benthamscience.com/journal/publishing-ethics.php?journalID=cdt#top>.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name: Francis Castellino

Affiliation: University of Notre Dame

Email: seemee.shabana@gmail.com

Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write info@benthamscience.org

Sincerely,

Editorial Office

Bentham Science Publishers

Current Drug Targets

<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CDT>

E-mail com a solicitação de correções (2 de novembro de 2016 06:38:36)

De: Current Drug Targets

<cdt@benthamscience.org<<mailto:cdt@benthamscience.org>>>

Enviado: quarta-feira, 2 de novembro de 2016 06:38:36

Para: Walter Filgueira de A Junior

Cc: Current Drug Targets

Assunto: [CDT] Editor Decision | BSP-CDT-2016-651

Reference#: BSP-CDT-2016-651

Submission Title: Understanding the Structural Basis for Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases. New Pieces in the Molecular Puzzle

Dear Dr. Walter F De AZEVEDO Jr.,

Thanks for submitting the manuscript to "Current Drug Targets". Your manuscript has been reviewed by the experts in the field, and the consensus is that it needs a revision with rewriting and checking. I am attaching the comments below and encouraging you to address the comments, revise the manuscript indicating the exact changes you made and to resubmit it at your earliest convenience.

Reviewers' comments:

Reviewer A:

In this review, you summarize recent developments of structural studies focused on inhibitors of CDK generated a theoretical framework to understand ligand binding affinity, which makes use of the simple paradigm of the molecular fork. The integration of functional and structural studies makes possible the development of high specific CDK inhibitors, such as purine analogues and flavonoid derivatives. He has also reported FDA approved CDK inhibitor (palbociclib), which is in phase III of clinical trial. This type of drug is developed by computer aided drug design approaches. Using structure /ligand based drug design research can predict the CDK-ligand interactions, biological activity through QSAR model, ADME and Toxicity for various kind targets. Author has also reported different type of CDK family, CDK structures, CDK in complex with inhibitors, CDK2 structure. In my opinion this review paper may be helpful for those research who working on Cyclin-dependent kinases inhibitor.

Reviewer B:

Mention that CDKs are also used to treat inflammation, eg Seliciclib. CDKs have some basal activity when phosphorylated, so it would be incorrect to state "CDK's are inactive as monomers". Reference = THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 274, No. 13, Issue of March 26, pp. 8746–8756, 1999 Nicholas R. Brown, Martin E. M. Noble, Alison M. Lawrie, May C. Morris, Paul Tunnah, Gilles Divita, Louise N. Johnson, and Jane A. Endicott CDK5 is regulated by p35 and p39 - so I'm not sure about sentence 3 paragraph 2 page 1.

Palbociclib is a CDK4/6 inhibitor and has been launched as a breast cancer, see http://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer_announces_european_medicines_agency_validates_marketing_authorization_application_for_ibrance_palbociclib_in_combination_with_endocrine_therapy_for_the_treatment_of_hr_her2_metastatic_breast_cancer This paragraph doesn't flow well, recommend starting a new paragraph.

Might be worth mentioning the first CDK to reach the clinic and the challenges with the further development of CDK inhibitors in the clinic? Reference this review on neurodegenerative disease and the impact of kinase regulation:

M. P. Mazanetz and P. M. Fischer. Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 6(6):464–79, 2007

There has been a lot of MD, Docking and QM studies on CDK2/5. Should reference these with regards to modelling protein flexibility. *Molecules*. 2014 Jun 30;19(7):9134-59 *J Cheminform*. 2011 Jan 10;3(1):2

It would be very beneficial to the readers to see a histogram of the amount of X-rays from the PDB for each CDK – and to make a comment on the diversity of the ligands bound. The literature is full of very similar data for CDK2, which has biased the information about kinase folds.

The figure 6 is a very poor correlation and probably shouldn't get a mention in this review article. Bascially it says that there is no correlation between the observed data and the PLANTS score. There is lack of consideration of non-classical interactions in drug design. Also there should be a mention of other design approaches, FBDD, LBDD etc.

There is a lot of new methods which are not covered in this review, nor is there an indepth analysis of the differences and similarity of kinases, the various strategies to address Type1-5 inhibitor design and challenges. It would be good to review the current understanding of residence time on drug efficacy.

Reviewer C:

This is an interesting review article that summarizes the progress of structural information on CDKs, highlighting the structural features for development of CDK inhibitors. These enzymes have been the object of extensive investigation, because of its importance in the regulation of the cell division cycle.

Furthermore, CDKs have caught attention as a target for development of anticancer drugs.

The title is relevant and the abstract adequately summarizes the work.

This review focuses on seven key issues:

1) INTRODUCTION:

Summarizes the state of art of functional and structural studies of CDKs

2) CDK FAMILY:

Describe the novel classification scheme of CDKs, which now comprise a protein family with twenty members identified in the human genome. In this scheme, CDKs is divided into eight subfamilies, three subfamilies are related to cell-cycle progression (CDK1, CDK4 and CDK5) and five other subfamilies are related to transcriptional CDKs (CDK7, CDK8, CDK9, CDK11 and CDK20).

3) CDK STRUCTURES:

Among the four techniques that can be used to determine the three dimensional structure of a protein (x-ray diffraction crystallography, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy, Electron Microscopy, and Neutron crystallography), the authors consider that the great majority of information available about the structure for these proteins were obtained by x-ray diffraction crystallography.

4) CDK2 STRUCTURE:

Authors summarize structural results that are relevant for determining the basis for CDK2 inhibition. The first structure of CDK to be solved was the CDK2, in the 1990s. The elucidation of the three-dimensional structures of CDK2, by means of x-ray diffraction crystallography, paved the way for application of bioinformatics and cheminformatics approaches to search for potential CDK inhibitors. One of the most successful inhibitors identified, so far, is “palbociclib”, which is currently in phase III of clinical trials with FDA approval.

5) CDK IN COMPLEX WITH INHIBITORS:

Describe the intermolecular contacts of CDK2 structures with competitive inhibitors. Authors consider that a key point in the design of specific inhibitors for a drug target is the possibility of application of computational methods to predict ligand-binding affinity based on the structural information of protein-ligand complex.

6) FUTURE DEVELOPMENTS:

They are addressed to the possibility to integrate structural and affinity information to build specific scoring function, tailored to CDK proteins, considering the integration of crystallographic, cheminformatics and bioinformatics techniques, it could be applied an integrated strategy for docking simulation and scoring function development.

7) CONCLUSION:

As conclusion, the authors develop a brief summary of the review.

This review is informative and the manuscript needs careful editorial revision for language.

I did not find the supplementary material 1 and 2.

With warm regards,

Shabana Seemee

Sr Manager Publications

Bentham Science Publishers

Current Drug Targets

<http://bsp-cms.eurekaselect.com/index.php/CDT>

E-mail com a confirmação do recebimento das correções (8 de novembro de 2016 03:10)

RE: [CDT] Editor Decision | BSP-CDT-2016-651

cdt [cdt@benthamscience.org]

Enviado: terça-feira, 8 de novembro de 2016 03:10

Para: Walter Filgueira de A Junior

Dear Dr. Walter

Thank you very much for your email.

I confirm the safe receipt of revised version and rebuttal letter.

Best regards,

Shabana Seemee

Sr Manager Publications

E-mail: shabana@benthamscience.org

Sign up today to your FREE journal Table of Contents alerts at URL:

<http://alerts.benthamscience.com>