

КАРПОВ П.А., ДЕМЧУК О.М.[✉], ОЖЕРЄДОВ С.П., СПІВАК С.І., РАЄВСЬКИЙ О.В., САМОФАЛОВА Д.О., БЛЮМ Я.Б.

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: demom79@gmail.com
[✉] demom79@gmail.com, (098) 951-69-77

ВИСОКОПРОПУСКНИЙ СКРИНІНГ ІНГІБІТОРІВ ТУБУЛІНІВ ПАРАЗИТИЧНИХ ГРИБІВ

Гриби (лат. *Fungi*) – окреме царство живих організмів що нараховує близько 100 тис. видів. Хоча переважна більшість грибів є сапрофітами, але існує ряд видів, які в ході еволюції обрали паразитичний тип існування. Переважна більшість грибів-паразитів вражають рослини (~10 тис. видів), але також відомо близько 400 видів хвороботворних грибів – збудників мікозів людини або тварин. На жаль, зростання випадків мікозів не вдалося зупинити і після впровадження новітніх фармацевтичних засобів. Мікози розвиваються повільно, рецидивують значно частіше, ніж бактеріальні інфекції, і не залишають після себе тривалого імунітету. Слід зазначити, що надійних лікарських засобів проти важких форм мікозів наразі не існує, до того ж існуючі молекулярні мішені і спрямовані на них агенти вичерпують свій ресурс. Тому нагальним є пошук кардинально нових цільових білків та їх інгібіторів.

Як відомо, цитоскелет і, зокрема, мікротрубочки та мікрофіламенти, є високодинамічними структурами клітини, функціонування яких забезпечує процеси мітозу, мейозу, цитокінезу, підтримки і адаптації форми клітин, екзо- та ендоцитоз, рух клітини, активний транспорт тощо [1, 2]. Добре відомо, що мікротрубочки завдяки здатності їх головного білка – тубуліну – специфічно зв'язувати низькомолекулярні сполуки різної природи, є відповідальними за реакцію еукаріотичних клітин у вигляді блокування мітозу на дію таких хімічних чинників [3, 4]. Саме тому α - і β -субодиниці тубуліну є важливими мішенями для широкого спектра препаратів, що використовуються як протипухлинні, фунгіцидні, гербіцидні, антипротозойні та протигельмінтні засоби. В нашій роботі запропоновано підхід до пошуку нових фунгіцидних сполук, який ґрунтується на використанні ідеології високо-

пропускного скринінгу для ідентифікації речовин, здатних впливати на мітотичний апарат паразитичних грибів за рахунок специфічного зв'язування з тубуліном.

Матеріали і методи

Пошук повних первинних послідовностей α -, β -, та γ -тубулінів патогенних грибів було проведено в онлайнній базі даних «UniProtKB» [5]. Моделювання тривимірних (3D) структур цих тубулінів було здійснено за допомогою сервера I-TASSER [6], призначеного для передбачення структури і функції білків. Для всіх даних моделей було проведено оптимізацію їхньої геометрії в силовому полі amber03 за допомогою пакету Gromacs [7].

Бібліотека лігандів з 7 млн речовин була підготовлена з врахуванням конфірмацій і парціальних зарядів (AM1-bcc) сполук, що були розраховані за допомогою програми Morac7 (www.cacheresearch.com/). Попередня фільтрація сполук виконувалася на підставі фізико-хімічних критеріїв правила п'яти (Rule of 5, ADMET, PAINS), а також результатів хемоінформаційного і QSAR аналізу. Високопропускний віртуальний скринінг сполук, які зв'язуються з тубуліном грибів, було проведено із використанням пакету UCSF Dock 6 [8]. Результуючий докінг у випадку найкращих лігандів α -, β -, та γ -тубулінів було здійснено із використанням локальної версії програмного пакету CCDC Gold [9].

Результати та обговорення

У результаті аналізу бази даних «UniProtKB» (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) було відібрано послідовності молекул тубулінів паразитичних грибів-збудників мікозів людини, тварин та рослин, що належать до родин: *Trichophyton*, *Microsporium*, *Arthroderma*,

Histoplasma, Blastomyces, Emmonsia, Uncinocarpus, Coccidioides, Paracoccidioides, Aspergillus, Botrytis cinerea, Sclerotinia, Rhynchosporium, Marssonina, Scedosporium, Fusarium, Gibberella, Candida, Ceraceosorus, Malassezia, Anthracocystis, Melanopsichium, Sporisorium, Ustilago, Cryptococcus, Trichosporon, Mucor, Rhizopus та *Lichtheimia*.

За допомогою програм молекулярного моделювання (I-TASSER) і молекулярної динаміки (Gromacs) було реконструйовано просторову структуру 93-х α -тубулінів, 95-ти β -тубулінів і 78-ми γ -тубулінів, які належать представникам 76 видів патогенних грибів. Попередня оцінка побудованих моделей виконувалась на підставі внутрішніх оціночних функцій I-TASSER, які певним чином оцінюють якість новоутвореної структури, ґрунтуючись на результатах аналізу кутів, відстаней і енергії. Водночас, після серії експериментів (визначення вільної енергії амінокислотних залишків, молекулярна динаміка, рухливий докінг) було вирішено, що порушення в укладці білка, які знаходились на достатній відстані від ГТФ-зв'язуючого сайту, не могли спричинити конформаційні зміщення для наступної деформації поверхні сайту.

У цілому, не дивлячись на певні відмінності, амінокислотний склад цього сайту був досить однаковий для всіх побудованих моделей і шаблонного білку з *Bos taurus* (1JFF, [10]). Спираючись на досить значну консервативність тубулінів, їх функціональну подібність та вищезазначені особливості будови в межах окремих груп кожного виду (ізотипи кожного з тубулінів), для подальшої роботи було відібрано по 5-ть представників кожного ізотипу, що мали найбільші відмінності. Відповідну кластеризацію білків було виконано спільно із візуальним порівнянням сайтів та орієнтацій ключових залишків. На цьому етапі, основна робота полягала у визначенні ключових представників реконструйованих молекул білків.

Високопропускний скринінг проводили у два відомих сайти зв'язування для кожної із досліджуваних моделей тубулінів паразитичних грибів: сайт зв'язування бензамідів/таксолу і сайт гідролізу ГТФ. База лігандів була підготовлена таким чином, щоб для всіх речовин були розраховані тривимірні структури та окремо були генеровані парціальні заряди AM1-bcc. Цього разу нами були використані

стандартні методи фільтрації під час розробки речовин, що передбачають їх відбір за фізико-хімічними параметрами, сформованих у відповідні правила (Rule of 5, ADMET, PAINS), а також на основі хемоінформаційного або QSAR аналізу.

Найкращі ліганди були відібрані за показниками оціночних енергій для кожного білка окремо. Високий ступінь гомології пояснює те, що нами було відібрано більше 200 речовин для сайту зв'язування ГТФ, оскільки всі вони мають відносно однакову спорідненість до всіх типів тубуліну. Серед них було відібрано найкращі позиції з найкомфортнішим розташуванням лігандів.

Для отримання більш вдосконалених моделей ліганд-білкової взаємодії після завершення етапу високопропускного скринінгу за допомогою програми Dock 6 для найкращих лігандів було проведено результуючий докінг із використанням локальної версії програми CCDC Gold. Найкращі ліганди були відібрані за показниками оціночних функцій енергій для кожного білка окремо. Результати аналізу ключових залишків у кристалічній структурі 1JFF, що відіграють значну роль у зв'язуванні субстратів, формуючи водневі зв'язки та електростатичні взаємодії, дозволили з'ясувати, які обмежувальні параметри можуть бути використані під час запуску генетичного алгоритму для того, щоб пошук йшов у потрібному напрямку. Параметри докінгу у програмі CCDC Gold були обрані за замовчуванням, лише якість пошуку була змінена за рахунок збільшення кількості операцій, кількості запусків та збільшенням рухливості лігандів. Для ГТФ-зв'язуючого сайту було вибрано 3 обов'язкових водневих зв'язки, для таксолю – лише один.

Після відбору головних оціночних функцій ASP та GoldScore для ряду структур було виконано візуальний аналіз, який полягав у порівнянні орієнтації функціональних груп закристалізованого субстрату та лігандів з нашої бібліотеки. Важливою обставиною є те, що в цьому випадку було вирішено використовувати штатну «опцію примушення» CCDC Gold, а саме за гідрофобною частиною пуринової основи лігандів та трьома групами водневих зв'язків (при аналізі речовина вважалася активною, якщо з кожної групи формувався хоча б один водневий зв'язок у результаті докінгу). Слід зазначити, що досить схожі за фізико-

хімічними властивостями групи лігандів займають однакові положення, а хімічний простір, сформований орієнтаціями докованих лігандів, відповідає як об'єму шаблонної молекули, так і фармакофорним типам атомів.

Було показано, що декілька лігандів можуть зв'язуватися із сайтами в усіх запропонованих моделях. Отже, можна зробити висновки щодо певної активності потенційних інгібіторів в умовах *in vitro*, але їх селективність проти різних видів викликає сумніви, адже, як вже згадувалося, показники докінгу не повністю корелюють із активністю та афінністю. Зважаючи на фізико-хімічні особливості молекул (їх розчинність та здатність до проникності), отримані результати будуть використані в якості білдінг-блоків для подальшої розробки нових сполук з антитубуліновою активністю із заміщенням активних груп, що є функціональними, або, за рекомендаціями хіміків-синтетиків, із заміною корової частини лігандів.

Загалом, за результатами високопропускового віртуального скринінгу більш ніж 7 млн речовин із використанням пакету UCSF Dock 6 нами було відібрано 200 перспективних речовин. На підставі аналізу оціночних функцій докінгу в програмі CCDC Gold, а також

візуальної оцінки побудованих комплексів було відібрано 30 найбільш перспективних сполук – потенційних інгібіторів тубулінів паразитичних грибів. Найбільш перспективними для подальшого лабораторного дослідження *in vitro* було визначено 19 сполук – похідних імідазолу.

Висновки

За результатами високопропускового віртуального скринінгу більше ніж 7 млн. речовин проти α -, β - та γ -тубулінів патогенних грибів із використанням пакету UCSF Dock 6 було відібрано 200 перспективних речовин. За результатами молекулярного докінгу в програмі CCDC Gold, а також, при наступному аналізі побудованих ліганд-білкових комплексів відібрано 30 лідерів, із яких 19 сполук імідазольної природи визначені як перспективні для подальшого експериментального дослідження.

Ця робота виконувалася за підтримки Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування Грід-технологій Українського національного Грїда (УНГ, <http://grid.nas.gov.ua>) та проектів комплексної програми наукових досліджень НАН України «Грїд-інфраструктура і Грїд-технології для наукових і науково-прикладних застосувань».

Література

1. Vignaud T., Blanchoin L., Théry M. Directed cytoskeleton self-organization // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22 (12). – P. 671–682.
2. Eren E.C., Gautam N., Dixit R. Computer simulation and mathematical models of the noncentrosomal plant cortical microtubule cytoskeleton // Cytoskeleton. – 2012. – V. 69 (3). – P. 144–154.
3. Sui M., Zhang H., Di X., Chang J., Shen Y., Fan W. G2 checkpoint abrogator abates the antagonistic interaction between antimicrotubule drugs and radiation therapy // Radiother. Oncol. – 2012. – V. 104 (2). – P. 243–248.
4. Zhao Y., Wu F., Wang Y., Chen S., Han G., Liu M., Jin D. Inhibitory action of chamaejasmin A against human HEP-2 epithelial cells: effect on tubulin protein // Mol. Biol. Rep. – 2012. – V. 39 (12). – p. 11105–11112.
5. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information // Nucl. Acids Res. – 2015. – V. 43 (D1). – P. D204–D212.
6. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // Nat. Protoc. – 2010. – V. 5 (4). – P. 725–738.
7. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // Bioinform. – 2013. – V. 29 (7). – P. 845–854.
8. Allen W.J., Balius T.E., Mukherjee S., Brozell S.R., Moustakas D.T., Lang P.T., Case D.A., Kuntz I.D., Rizzo R.C. DOCK 6: impact of new features and current docking performance // J. Comput. Chem. – 2015. – V. 36. – P. 1132–1156.
9. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 267. – P. 727–748.
10. Löwe J., Li H., Downing K.H., Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 313. – P. 1045–1057.

KARPOV P.A., DEMCHUK O.M., OZHEREDOV S.P., SPIVAK S.I., SAMOFALOVA D.O., RAYEVSKY O.V., BLUME Ya.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovs'kogo str., 2A, e-mail: demom79@gmail.com*

HIGH THROUGHPUT SCREENING OF TUBULIN INHIBITORS FROM PARASITIC FUNGI

Aim. Implementation of 3D-modeling, molecular dynamics, high-throughput screening and molecular docking for search of new inhibitors of parasitic fungi tubulin. **Methods.** Protein structures were constructed using I-TASSER server and optimized by Gromacs. Ligands library was prepared in Mopac7 program and screened using UCSF Dock 6. Best ligands were docked in CCDC Gold. **Results.** It was reconstructed spatial molecular structure for 93 α -, 95 β - and 78 γ -tubulins from 76 species of pathogenic fungi genus: *Microsporium*, *Arthroderma*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Uncinocarpus*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Aspergillus*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia*, *Rhynchosporium*, *Marssonina*, *Scedosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Candida*, *Ceraceosorus*, *Malassezia*, *Anthracocestis*, *Melanopsichium*, *Sporisorium*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Mucor*, *Rhizopus* and *Lichtheimia*. Libraries of 3D-models of parasitic fungi tubulins and perspective ligands were created. Based on results of high-throughput virtual screening, 200 perspective agents were selected from more than 7 million compounds. After resulting molecular docking in CCDC GOLD, we specify 19 leading compounds. We propose these compounds as potent tubulin inhibitors and recommend them for *in vitro* testing as new fungicides. **Conclusions.** Based on results of high-throughput virtual screening in Grid, 19 new imidazole inhibitors of parasitic fungi tubulin were selected.

Keywords: microtubule, tubulins, fungicides, imidazole derivatives, virtual screening, molecular docking.