

РЕКОНСТРУКЦІЯ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ПРОСТОРОВОЇ СТРУКТУРИ МОЛЕКУЛ ТУБУЛІНІВ ПРЕДСТАВНИКІВ *DIPLOMONADIDA*, *KINETOPLASTIDA*, *AMOEBIDA*, *SACCHAROMYCETES* ТА *MICROSPOREA*

Активність ряду сполук, які можуть бути використані в якості антигельмінтних, протитуберкульозних та інших препаратів, безпосередньо пов'язана з їх здатністю впливати на процеси мітотичного циклу. До них належать сполуки нітро- та динітроанілінового ряду (класичні представники трифлюоралін та оризалін), бензимидазольного ряду (бенаміл), трополонові алкалоїди (колхіцин) та інші [1, 2]. Біологічна активність вище згаданих сполук у першу чергу обумовлена їх здатністю специфічно зв'язуватися з молекулами тубулінів, внаслідок чого відбувається повне або часткове блокування процесів полімеризації мікротрубочок та порушення архітектури цитоскелету. Афіність вищезгаданих сполук до молекул тубулінів різного походження та значний рівень активності робить їх привабливими кандидатами для подальшого удосконалення шляхом хімічного дизайну та синтезу нових більш ефективних похідних.

Мета дослідження – реконструкція та верифікація просторової структури молекул тубулінів представників *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* та *Microsporea* і депонування їх у базі даних CSMoDB, що була створена у рамках діяльності віртуальної організації VO CSLabGrid, для подальшого з'ясування відмінностей просторової структури, уточнення механізму їх взаємодії з різними антимітотичними агентами та використання у високопропускну віртуальному скринінгу бібліотек низькомолекулярних сполук, з метою пошуку високоефективних антимітотичних агентів з високим рівнем афіності до тубулінів певного походження.

Матеріали і методи

Для пошуку амінокислотних послідовностей молекул тубулінів використовували загальнодоступний банк амінокислотних послідовностей UniProtKB (www.expasy.org).

Реконструкцію просторової структури молекул тубулінів здійснювали методом моделювання по гомології із використанням *on line* сервісів SWISS-MODEL та I-TASSER [3–7]. Для

цього нами було виконано пошук та добір з бази даних RCSB Protein Data Bank експериментально підтверджених просторових структур білків, які придатні для використання їх в якості матриць.

Оптимізацію геометрії отриманих промоделей проводили шляхом мінімізації енергії молекул тубулінів згідно з методом L-BFGS [8]. Верифікацію якості промоделей здійснювали із використанням *on line* сервісу MolProbity [9, 10].

Результати та обговорення

Амінокислотні послідовності молекул тубулінів з представників *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* та *Microsporea* було отримано з банку амінокислотних послідовностей UniProtKB. За результатами пошуку було знайдено 567 амінокислотних послідовностей вищезгаданих представників, з яких для подальшої роботи було відібрано 17 білків з повністю розшифрованою первинною структурою та з'ясованою функцією, а саме послідовності молекул альфа-тубулінів з *Entamoeba histolytica* (P31017), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (P04106), *Trypanosoma cruzi* (Q27352), *Candida albicans* (P87066), *Encephalitozoon cuniculi* (Q8SRI6), бета-тубулінів з *Giardia intestinalis* (P05304), *Leishmania mexicana* (P21148), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (P04107), *Trypanosoma cruzi* (P08562), *Encephalitozoon intestinalis* (Q9GSR5), *Encephalitozoon hellem* (Q24829), *Encephalitozoon cuniculi* (Q8SS99), *Candida albicans* (P10875), гамма-тубуліну з *Entamoeba histolytica* (P54401), *Encephalitozoon cuniculi* (Q8SRD2), *Candida glabrata* (Q6FNU9), *Candida albicans* (O93807).

Наступним етапом роботи було проведення реконструкції просторової структури молекул тубулінів методом *in silico*. Для цього виконано пошук та добір з бази даних RCSB Protein Data Bank експериментально підтверджених просторових структур білків, які придатні для використання їх в якості матриць. Сканування виявило 21 потенційну матрицю для реконструкції просторової структури молекул альфа-, бета-тубу-

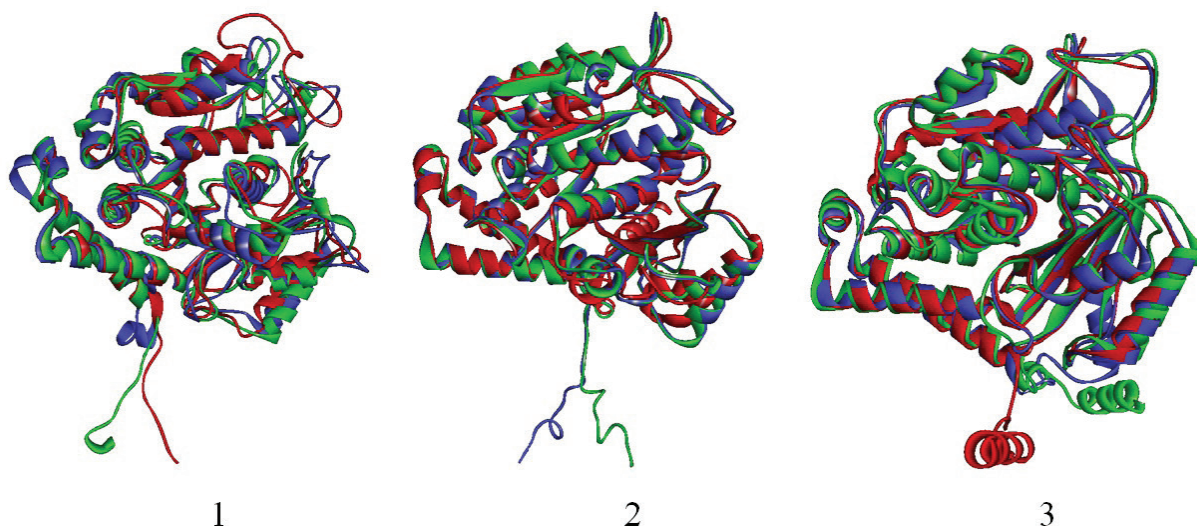


Рис. 1. Реконструйовані моделі тубулінів різного походження: 1. *Entamoeba histolytica* (P31017), 2. *Giardia intestinalis* (P05304), 3. *Entamoeba histolytica* (P54401)

лінів, та 4 потенційні матриці для реконструкції просторової структури гама-тубулінів, що відповідає кількості депонованих в ній експериментально визначених структур білків тубулінів, які містять відповідні субодиниці, а саме: 1 із *Sus scrofa* (P02550), 11 із *Ovis aries* (D0VWZ0), 9 із *Bos taurus* (Q2HJ86 і Q3ZCJ7) та 4 із *Homo sapiens* (P23258).

За допомогою *on line* сервісів SWISS-MODEL та I-TASSER побудовано промоделі просторової структури молекул тубулінів представників *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* та *Microsporea*. У результаті проведеної роботи було отримано 16 промоделей просторової структури молекул альфа-тубулінів, 40 промоделей бета-тубулінів та 16 промоделей гама-тубулінів різного походження, зразки яких наведені на рисунку 1.

Оптимізацію геометрії побудованих нами промоделей здійснювали шляхом мінімізації енергії згідно з методом L-BFGS. Верифікацію якості оптимізованих промоделей здійснювали за допомогою *on line* сервісу MolProbity. Добір промоделей для подальших експериментів здій-

снювали за показниками їх якості. Як показали результати верифікації, всі реконструйовані нами промоделі мали задовільну якість геометрії (табл. 1). Для використання у подальшій роботі були відібрані моделі, які мали найбільш оптимальні показники геометрії.

Відібрані моделі просторової структури молекул тубулінів додано до бази даних CSMoDB у рамках діяльності віртуальної організації VO CSLabGrid для подальшого їх використання у експериментах.

Висновки

У ході виконання роботи із використанням методів *in silico* були отримані моделі просторових структур молекул альфа-, бета- та гама-тубулінів представників *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* та *Microsporea* для подальшого використання у роботі з пошуку нових сполук з антимітотичною активністю. Результати досліджень додано до бази даних CSMoDB у рамках діяльності віртуальної організації VO CSLabGrid.

Таблиця 1

Оцінка якості побудованих промоделей за допомогою MolProbity

№	Організм	Субдодія	Індекс послідовності за UniProtKB	I-TASSER: C-score TM-score RMSD	Poor rotamers Goal: <1 %	Ramachandran outliers Goal: <0,05 %	Ramachandran favored Goal: >98 %	Св deviations >0,25E Goal: 0	Bad backbone bonds: Goal: 0 %	Bad backbone angles: Goal: <0,1 %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	<i>Entamoeba histolytica</i>	a	P31017	0,30 0,86±0,07 4,8±3,1	18,56 %	5,74 %	74,61 %	13,51 %	0,00 %	1,67 %
2		g	P54401	-0,50 0,72±0,11 7,0±4,1	19,42 %	4,23 %	78,17 %	16,94 %	0,00 %	1,33 %
3	<i>Giardia intestinalis</i>	b	P05304	-0,14 0,84±0,08 5,1±3,3	20,16 %	4,05 %	78,15 %	12,50 %	0,00 %	1,36 %
4		b	P21148	0,32 0,76±0,10 6,4±3,9	18,75 %	6,09 %	78,10 %	12,53 %	0,00 %	1,35 %
5	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	a	P04106	0,32 0,91±0,06 4,2±2,8	17,02 %	10,02 %	68,37 %	17,07 %	0,00 %	1,59 %
6		b	P04107	0,18 0,85±0,08 4,9±3,2	19,74 %	4,55 %	77,27 %	13,83 %	0,00 %	1,31 %
7	<i>Trypanosoma cruzi</i>	a	Q27352	-2,99 0,91±0,06 4,2±2,8	16,31 %	7,57 %	70,82 %	15,87 %	0,00 %	1,34 %
8		b	P08562	-0,04 0,86±0,07 4,8±3,1	16,31 %	7,57 %	70,82 %	15,87 %	0,00 %	1,34 %
9	<i>Candida albicans</i>	a	P87066	0,32 0,89±0,07 4,4±2,9E	17,02 %	4,71 %	77,13 %	11,14 %	0,00 %	1,19 %
10		b	P10875	-2,20 0,81±0,09 5,6±3,5E	16,15 %	6,04 %	79,64 %	13,16 %	0,00 %	1,28 %

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
11	<i>Candida albicans</i>	g	O93807	-3,37 0,65±0,13 8,4±4,5E	18,81 %	9,20 %	72,00 %	17,56 %	0,00 %	1,69 %
12	<i>Candida glabrata</i>	g	Q6FNU9	-0,69 0,74±0,11 6,8±4,0E	18,27 %	5,83 %	75,81 %	13,99 %	0,03 %	1,70 %
13	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	a	Q8SRI6	0,30 0,92±0,06 3,9±2,7	18,40 %	4,56 %	77,45 %	13,87 %	0,00 %	1,59 %
14	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	b	Q8SS99	0,42 0,84±0,08 5,0±3,3	20,05 %	4,12 %	81,24 %	11,60 %	0,00 %	1,35 %
15	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	g	Q8SRD2	1,10 0,86±0,07 7±3,1	15,04 %	6,02 %	79,17 %	12,22 %	0,00 %	1,31 %
16	<i>Encephalitozoon hellem</i>	b	Q24829	0,55 0,83±0,08 5,2±3,4	20,26 %	4,81 %	77,80 %	11,85 %	0,00 %	1,01 %
17	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	b	Q9GSR5	0,85 0,83±0,08 5,2±3,3	17,63 %	3,66 %	77,80 %	11,36 %	0,00 %	1,03 %

ЛІТЕРАТУРА

1. Брицун В.М., Ємець А.І., Лозинський М.О., Блюм Я.Б. 2,6-Динітроаніліни: синтез, гербіцидні й антипротозойні властивості // *Ukr. Bioorg. Acta.* – 2009. – 7, № 1. – С. 16–27.
2. Kingston D.G. Tubulin–interactive natural products as anticancer agents // *J. Nat. Prod.* – 2009. – 72, N 3. – P. 507–515.
3. Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information // *Nuc. Acids Res.* – 2014. – 42, N 1. – P. 252–258.
4. Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling // *Bioinform.* – 2006. – 22. – P. 195–201.
5. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // *Nature Methods* – 2015. – 12. – P. 7–8.
6. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // *Nature Protocols.* – 2010. – 5. – P. 725–738.
7. Zhang Y. Progress and challenges in protein structure prediction // *Cur. Opin. Str. Biol.* – 2008. – 18, N 3. – P. 342–348.
8. Nocedal J., Wright S. Numerical Optimization. – 2nd edition. – USA: Springer, 2006.
9. Chen V.B., Arendall W.B. 3rd, Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // *Act. Cryst.* – 2010. – 66. – P. 12–21.
10. Davis I.W., Leaver-Fay A., Chen V.B., Block J.N., Kapral G.J., Wang X., Murray L.W., Arendall W.B. 3rd, Snoeyink J., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids // *Nuc. Acids Res.* – 2007. – 35. – P. 375–383.

SPIVAK S.I., OZHEREDOV S.P., SAMOFALOVA D.O., RAYEVSKY O.V., KARPOV P.A.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine,
Ukraine 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: Svetlana_spivak@ukr.net*

RECONSTRUCTION AND VERIFICATION OF SPATIAL MOLECULAR STRUCTURE OF TUBULIN WITH THE KINETOPLASTIDA, EOPHARYNGIA, ARCHAMOEBAE, SACCHAROMYCETES AND MICROSPORIDIA

Aims. The purpose of this study was a reconstruction and verification of spatial structures of tubulin molecules from representatives of *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* and *Microsporea* to determine differences in their spatial structures and clarify the mechanism of their interaction with antimetabolic agents. **Methods.** The study was carried out with *in silico* approaches using UniProtKB database, RCSB Protein Data Bank and on-line services: SWISS-MODEL, I-TASSER and MolProbity. **Results.** 17 tubulin molecules with fully decoded primary structures were selected among representatives of such classes: *Diplomonadida*, *Kinetoplastida*, *Amoebida*, *Saccharomycetes* and *Microsporea*. For all these proteins accurate three dimensional structures were constructed with subsequent optimization and verification of protein geometry. **Conclusions.** Selected models of tubulin molecules were added to a CSMoDB database within VO CSLabGrid for their future application in comparative analysis and a search of compounds with anti mitotic activity by means of high-throughput screening.

Keywords: tubulin, antimetabolic drugs, *in silico*.