

РАЄВСЬКИЙ О. В.[✉], ДЕМЧУК О. М., КАРПОВ П. А., ОЖЕРЄДОВ С. П., СПВАК С. І., СМЕЦЬ А. І., БЛЮМ Я. Б.

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

[✉] rayevsky85@gmail.com, (050) 794-20-91

ВІРТУАЛЬНИЙ СКРИНІНГ СПЕЦИФІЧНИХ ІНГІБІТОРІВ α -ТУБУЛІНУ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *PLASMODIUM*

Мета. Пошук похідних динітроаніліну і фосфоротіоаміду, здатних до селективної взаємодії з α -тубуліном паразитів роду *Plasmodium*, із метою інгібування мітотичного апарату збудників малярії. **Методи.** Структурно-біологічне дослідження ліганд-білкової взаємодії: молекулярна динаміка, докінг, метод фармакофорний аналіз. Відбір сполук за фармакофорними ознаками, віртуальний скринінг лігандів. **Результати.** Було визначено протокол і необхідні структурні умови підготовки моделі α -тубуліну *P. falciparum*, що забезпечують коректне моделювання ліганд-білкової взаємодії (докінгу і віртуального скринінгу) цільових сполук. Визначено узагальнену фармакофорну модель ліганд-білкової взаємодії і ключові функціональні групи лігандів, що відповідають за специфічне зв'язування з мішенню. **Висновки.** Відібрано 22 комерційні сполуки, що на підставі результатів скринінгу визначено як перспективні інгібітори мітотичного апарату видів паразитів роду *Plasmodium*, характерних для республіки Індія.

Ключові слова: малярія, *Plasmodium*, α -тубулін, міжмолекулярна взаємодія, похідні динітроаніліну, похідні фосфоротіоаміду.

Аналіз наукової літератури, баз даних та наші попередні дослідження визначили існування чотирьох видів паразитів роду *Plasmodium* на території республіки Індія, а також довели ідентичність сайту і механізмів зв'язування похідних динітроаніліну і фосфоротіоаміду з молекулами α -тубуліну [1, 2].

На сьогодні кілька класів інгібіторів мікротрубочок демонструють потужну активність проти малярійних паразитів *in vivo*: вінбластин, доластатин 10, ауристатини та таксоїди. Більшість із цих агентів здатні порушувати нативну структуру мікротрубочок. На жаль, майже всі ці сполуки також демонструють значну токсичність і до клітин ссавців [3], що цілком

пов'язано із міжвидовою консервативністю молекул тубуліну [4]. Тубуліни *P. falciparum* і людини виявляють ~83 % та ~87 % подібності у випадку ізотипів α - та β -тубуліну відповідно. Проте було встановлено, що похідні динітроаніліну (трифлуралін, хлоралін, оризалін, пендіметалін) та фосфоротіоаміду (амінпрофосметил) дестабілізують спільний динітроанілін / фосфоротіоамідний сайт на поверхні α -тубуліну рослин. Доведено, що вищезазначені сполуки мають значну спорідненість із рослинним α -тубуліном, а їх зв'язування гальмує збирання мікротрубочки [5, 6]. Також було доведено, що сайт специфічного зв'язування похідних динітроаніліну і фосфоротіоаміду у людини відсутній [4]. Однак цей сайт було знайдено у деяких протозойних організмів [4, 7]. Це пояснює, чому існують похідні динітроаніліну, які більш ніж у 800 разів ефективніші проти найпростіших, ніж проти різних клітинних ліній людини [8].

Доведено, що динітроаніліни та фосфоротіоаміди, які в більшості випадків активні проти мікротрубочок рослин, також є активними проти *P. falciparum* і, таким чином, можуть виступати в ролі протималярійних препаратів [9]. Фосфоротіоаміди також мають подібний до динітроанілінів вплив на рослини та зв'язуються з тим самим рецепторним сайтом. Крім того, фосфоротіоаміди мають більш ніж в 100 разів вищу розчинність у воді. У зв'язку з цим, на нашу думку, ці сполуки мають значно більший потенціал, ніж динітроаніліни, для яких підтримка високої концентрації в лікарських препаратах є проблематичною [10]. Таким чином, у цьому проекті ми розглядаємо динітроаніліни та фосфоротіоаміди як найбільш перспективні групи антималярійних агентів.

Актуальне дослідження об'єднує досвід і ресурси дослідницьких груп з України та Республіки Індія з метою відбору нових високое-

фективних та специфічних протималарійних препаратів, що діють безпосередньо на мітотичний апарат паразитів роду *Plasmodium*. За допомогою високопропускнуго віртуального скринінгу та із застосуванням методів структурної біоінформатики і молекулярної динаміки планується відібрати нові потенційні інгібітори мітотичного апарату *Plasmodium* sp.

Матеріали і методи

Симуляція молекулярної динаміки здійснювалася в програмному пакеті GROMACS 2018 [11] з використанням силового поля CHARMM36 і даних із топології та параметрів молекули ГТФ, згенерованих за допомогою сервера SwissParam.ch, у випадку короткотривалої 100 нс. повноатомної динаміки та «крупнозернистого» силового поля SIRAH2.0 [12] у випадку довготривалої в 1 мкс.

Усі процеси візуалізації та оцінювання результатів молекулярної динаміки було виконано за допомогою програмного пакета PyMol 2.3.

Підготовка моделей референсних лігандів [2] для докінгу проводилася в UCSF Chimera, жодних примусів для формування водневих зв'язків або розташування функціональних груп під час процедури докінгу не було застосовано. Молекулярний докінг було виконано в програмі CCDC Gold 5.1 [13] із використанням генетичного алгоритму для генерації конформацій ліганду та наступних параметрів докінгу: розмір популяції 100, вибірка 1.1, островів 10, генетичних операцій 100.000. Відбір отриманих конформацій здійснювався на підставі базових оціночних функцій: ChemScore, ASP та GoldScore [23].

Фільтрація бази лігандів із майже 15 мільйонів речовин за медико-хімічними обмеженнями та PAINS-фільтрами, що видаляють небажані з біологічної точки зору структури, була проведена за допомогою програми DataWarrior та набору скриптів RDKit [14]. Параметризація лігандів відповідала умовам роботи в програмному пакеті Dock 6 [15]. Підготовка структури α -тубуліну для високопропускнуго скринінгу проводилася в програмному пакеті UCSF Chimera. Консервативні ознаки ліганд-білкової взаємодії визначалися на підставі структурного вирівнювання отриманих комплексів. Електростатичні особливості сайтів визначалися на основі методу зондування молекулами води. Функціонально-важливі залишки мішені визначалися

на підставі дистанції 10–11 Å відносно молекул контрольних лігандів.

Найбільш перспективні конформомери попередньо визначених сполук-лідерів визначалися за оптимальними показниками «Docking Score» і «Energy strain» та додаткового показника «Efficiency».

Ресурсоемні обчислювання здійснювалися за допомогою кластера ДУ «ІХБГ НАН України».

Результати та обговорення

Насамперед слід зауважити, що порівняння результатів молекулярної динаміки повноатомної та «крупнозернистої» систем комплексу α -тубуліну плазмодія з ГТФ певним чином підтверджує можливість застосування траєкторії з повноатомної молекулярної динаміки для поточних досліджень проєкту.

Для коректності операцій докінгу було необхідно вибрати контрольні зразки флуктуацій протягом молекулярної динаміки, що відповідають найбільш стабільним та водночас конформаційно відмінним станам системи. Як показав аналіз показників RMSD амінокислот досліджуваного сайту зв'язування, поведінка оточення цього сайту була більш експресивною, ніж на інших ділянках цільової білкової молекули. В ході цього етапу досліджень нам вдалося виявити консервативні кластери, які містили ряд ключових структур та визначали особливості структури сайту зв'язування досліджуваних сполук. До зазначених кластерів потрапляли лише конформації, що характеризувалися кроком зміщення атомів сайту за показниками RMSD щонайменше в 0.15 нм.

Таким чином, було визначено одинадцять конформацій цільового сайту мішені у випадку використання повноатомної системи і п'ятнадцять у випадку використання «крупнозернистої» системи. Ключовим критерієм було те, що вони залишалися стабільними протягом досить тривалого часу та демонстрували структурну регулярність упродовж певних часових інтервалів. Візуальний аналіз структурних особливостей сайту дозволив скоротити перспективні конформації тубуліну до п'яти, відсіявши схожі між собою. Порівнявши їх між собою, було зроблено висновок щодо тенденції у поведінці білкових структур: в обох траєкторіях проявляють досить значну подібність, незважаючи на десятикратну різницю у тривалості часу симуляції.

Для наочності та негативного контролю аналогічні симуляції було виконано для трьох ізотипів тубуліну людини, але жодна структура не показала наявності сайту зв'язування похідних ряду динітроанілінів і фосфоротіоамідатів.

Визначення фармакофорних моделей здійснювалося за результатами повторного молекулярного докінгу референтних лігандів [2] в основні альтернативні конформації цільового сайту α-тубуліну. Контрольні ліганди (сполуки з доведеною антимікротрубочковою активністю) складають дуже невелику групу специфічних за розміром сполук. Беручи до уваги розмір сайту зв'язування та значну подібність референтних сполук, жодних примусів, що впливали б на формування водневих зв'язків або розташування функціональних груп, під час докінгу не застосовувалося.

Результати молекулярного докінгу підтвердили спорідненість усіх контрольних сполук до цільового сайту. Зазначена процедура докінгу дозволила визначити ключові амінокислоти, здатні формувати водневі зв'язки, та порівняти значення енергій одних і тих же молекул у сайтах різних білків. Відбір здійснювався на підставі базових оціночних функцій CCDC Gold 5.1, кожна з яких давала вичерпну інформацію щодо отриманої конформації. У деяких випадках було використано моделювання рухливості ключових залишків, що збільшувало простір аналізу.

Після аналізу результатів усіх п'яти запусків докінгу нами було визначено ряд збігів для двох груп лігандів, що відрізнялися довжиною та орієнтацією в сайті зв'язування.

Первинний скринінг бази речовин, що налічувала майже 15 мільйонів записів, було здійснено фільтрацією за медико-хімічними та PAINS (pan assay interference compounds) фільтрами, що видаляють небажані з біологічної точки зору структури. В результаті отримано остаточну вибірку для скринінгу, в якій запис кожної молекули передбачав набір фізико-хімічних показників, електростатичну мапу поверхні, а також як вихідну геометрію, так і ряд згенерованих конформерів.

Підготовка структури білка-мішені для високопропускового скринінгу проводилася шляхом визначення особливостей взаємодії за допомогою ліганд-опосередкованого структурного вирівнювання комплексів. Таким чином, було максимально перекрито хімічний простір, що був сформований референсними сполуками.

Скринінг та аналіз результатів із використанням трьох конформацій цільового сайту не видається можливим через значну кількість вихідних молекул. Тому наступне визначення активних конформерів скринінгу здійснювалося на підставі показників «Docking Score» та «Energy strain», що дозволяють виконати кількісну оцінку енергій внутрішньої напруги кожної конформації. Як додатковий використовувався показник «Efficiency», який представляє собою суму водневих зв'язків та стекінгових взаємодій між амінокислотами сайту та лігандом.

За результатами молекулярного скринінгу було отримано бібліотеку із 10 тисяч речовин, що відповідають критеріям розміру чи кількості зв'язків.

Загалом за результатами високопропускового скринінгу із використанням вищезазначеного протоколу було визначено 22 сполуки, а саме:

- ✓ Pyrrolidine-3,4-dicarboxamide
- ✓ rac-(2R)-2-hydroxy-2-(1H-imidazol-5-yl)-1-[4-[rac-(1R,2S)-2-hydroxycyclopentyl]piperazin-4-ium-1-yl]ethanone
- ✓ 2-[4-({Imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)methyl}piperazin-1-yl]propanamide
- ✓ 4-methyl-5-[rac-(2R,3S)-3-cyclopropyl-1-[3-(1H-imidazol-5-yl)propanoyl]pyrrolidin-2-yl]-4-aza-1-azonia-2-azanidacyclopent-5-en-3-one
- ✓ 4-chloro-5-{[2-(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)propyl]amino}-2,3-dihydropyridazin-3-one
- ✓ [(6R)-3-carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-6-yl]methyl-(imidazo[1,2-a]pyridin-1-ium-5-ylmethyl)ammonium
- ✓ 1-({6,8-dichloroimidazo[1,2-a]pyridin-2-yl)methyl)-4-(4H-1,2,4-triazole-3-sulfonyl)piperazine
- ✓ [rac-(3S)-pyrrolidin-1-ium-3-yl]methanesulfonamide
- ✓ 2-[4-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-ylmethyl)piperazin-1-yl]propanamide
- ✓ 1-ethyl-4-[(1-propan-2-ylimidazol-4-yl)sulfonylamino]pyrazole-3-carboxamide
- ✓ 5-(aminomethyl)-4,5-dihydro-1,2-oxazole-3-carboxamide; hydrochloride
- ✓ 3-[3-[[3-[3-(5-oxo-1,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-yl)propylamino]pyridin-2-yl]amino]propyl]-1,4-dihydro-1,2,4-triazol-5-one
- ✓ N-[4-(1H-indol-3-yl)-1,3-thiazol-2-yl]-2-(5-oxo-1H-1,2,4-triazol-4-yl)acetamide

✓ [rac-(3S)-pyrrolidin-1-ium-3-yl]methanesulfonamide
 ✓ 4-(azaniumylmethyl)-3-hydroxybenzoate
 ✓ rac-(7R)-4-azoniaspiro[2.5]octane-7-carboxamide
 ✓ 2-carbamoylpiperidine-4-carboxylic acid; hydrochloride
 ✓ 2-(methylamino)-2-pyridin-4-ylpropanamide; dihydrochloride
 ✓ 2-(4-methyl-1H-imidazol-5-yl)-N-[[rac-(2S,3S,4S)-4-ethyl-3-(3-methylimidazol-1-ium-4-yl)morpholin-4-ium-2-yl]methyl]acetamide
 ✓ [1-carbamoyl-3-(difluoromethyl)cyclobutyl]ammonium

✓ 5-[1-(1H-imidazol-2-ylmethyl)piperidin-3-yl]-1H-pyrazole-3-carboxamide
 ✓ 2-[3-(1H-benzimidazol-2-yl)piperidin-1-yl]pyridine-4-carboxamide

Висновки

Представлені 22 сполуки розглядаються нами як перспективні інгібітори α -тубуліну *Plasmodium falciparum* і обрані для подальшого остаточного структурно-біологічного й експериментального дослідження.

Робота виконана за підтримки міжнародного Україно-Індійського науково-дослідного проекту 2019–2021 рр. у рамках співпраці між Міністерством освіти і науки України та Департаментом науки та технологій Міністерства науки та технологій Республіки Індія.

References

1. Karpov P.A., Demchuk O.M., Ozheredov S.P., Spivak S.I., Yemets A.I., Blume Ya.B. Conservation of dinitroaniline/phosphorothioamidate site of α -tubulin in *Plasmodium* species distributed in India. *Factors of the Experimental Evolution of Organisms*. 2019. Vol. 24. P. 327–332. doi: 10.7124/FEEO.v24.1124.
2. Blume Ya.B., Rayevsky A.V., Yemets A.I., Demchuk O.M., Karpov P.A., Ozheredov S.P., Spivak S.I. P152 Alanine scanning of dinitroaniline/phosphorothioamidate binding site on α -tubulin of *Plasmodium* species. *Cell Bio*. 2020 Virtual-an Online ASCB|EMBO Meeting. Retrieved from: <https://www.ascb.org/cellbiovirtual2020/>.
3. Bell A. Microtubule inhibitors as potential antimalarial agents. *Parasitol. Today*. 1998. Vol. 14. P. 234–240.
4. Fennell B.J., Naughton J.A., Dempsey E., Bell A. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on *Plasmodium falciparum*: tubulin as a specific antimalarial target. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006. Vol. 145 (2). P. 226–238.
5. Blume Ya.B., Nyporko A.Yu., Yemets A.I., Baird W.V. Structural modeling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides. *Cell Biol. Int.* 2003. Vol. 27 (3). P. 171–174.
6. Yemets A.I., Blume Y.B. Antimitotic drugs for microprotoplast-mediated chromosome transfer in plant genomics, cell engineering and breeding. In: Blume Y.B., Baird W.V., Yemets A.I., Breviaro D. (eds) *The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology*. Springer, Dordrecht. 2008. P. 419–434.
7. Lyons-Abbott S., Sackett D.L., Wloga D., Gaertig J., Morgan R.E., Werbovetz K.A., Morrissette N.S. α -Tubulin mutations alter oryzalin affinity and microtubule assembly properties to confer dinitroaniline resistance. *Eukaryot Cell*. 2010. Vol. 9 (12). P. 1825–1834. doi: 10.1128/EC.00140-10.
8. Morgan R.E., Ahn S., Nzimiro S., Fotie J., Phelps M.A., Cottrill J., Yakovich A.J., Sackett D.L., Dalton J.T., Werbovetz K.A. Inhibitors of tubulin assembly identified through screening a compound library. *Chem. Biol. Drug Design*. 2008. Vol. 72 (6). P. 513–524.
9. Corral M.G., Leroux J., Stubbs K.A., Mylne J.S. Herbicidal properties of antimalarial drugs. *Sci. Repts*. 2017. Vol. 7. P. 45871. doi: 10.1038/srep45871.
10. Dhooghe E., Van L.K., Eeckhaut T., Leus L., Van H.J. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 2011. Vol. 104. P. 359–373.
11. Kutzner C, Páll S, Fechner M, Esztermann A, de Groot BL, Grubmüller H. More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *J Comput Chem*. 2019. Vol. 40 (27). P. 2418–2431. doi: 10.1002/jcc.26011.
12. Machado M.R., Barrera E.E., Klein F., Sónora M., Silva S., Pantano S. The SIRAH 2.0 force field: altius, fortius, citius. *J. Chem. Theor. Comput.* 2019. Vol. 15 (4). P. 2719–2733. doi: 10.1021/acs.jctc.9b00006.
13. Liebeschuetz J.W., Cole J.C., Korb O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2012. Vol. 26 (6). P. 737–748. doi: 10.1007/s10822-012-9551-4.
14. López-López E., Naveja J.J., Medina-Franco J.L. DataWarrior: an evaluation of the open-source drug discovery tool. *Expert Opin. Drug Discov.* 2019. Vol. 14 (4). P. 335–341. doi: 10.1080/17460441.2019.1581170.
15. Allen W.J., Balias 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. Vol. 36 (15). P. 1132–1156. doi: 10.1002/jcc.23905.

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

Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: rayevsky85@gmail.com

STRUCTURE-BASED VIRTUAL SCREENING FOR NEW LEAD COMPOUNDS TARGETED *PLASMODIUM* α -TUBULIN

Aim. Search for new dinitroaniline and phosphorothioamide compounds, capable of selective binding with *Plasmodium* α -tubulin, affecting its mitotic apparatus. **Methods.** Structural biology methods of computational prediction of protein-ligand interaction: molecular docking, molecular dynamics and pharmacophore analysis. Selection of compounds based on pharmacophore characteristics and virtual screening results. **Results.** The protocol and required structural conditions for target (α -tubulin of *P. falciparum*) preparation and correct modeling of the ligand-protein interaction (docking and virtual screening) were developed. The generalized pharmacophore model of ligand-protein interaction and key functional groups of ligands responsible for specific binding were identified. **Conclusions.** Based on results of virtual screening, 22 commercial compounds were selected. Identified compounds proposed as potential inhibitors of *Plasmodium* mitotic machinery and the base of new antimalarial drugs.

Keywords: malaria, *Plasmodium*, intermolecular interaction, dinitroaniline derived, phosphorothioamide derived.