

СПИВАК С.І.[✉], ДЕМЧУК О.М., КАРПОВ П.А., ОЖЕРЄДОВ С.П., БЛЮМ Я.Б.*Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,**Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: svetlana_spivak@ukr.net*[✉]svetlana_spivak@ukr.net, (050) 159-00-57

СТВОРЕННЯ БІБЛІОТЕКИ МОДЕЛЕЙ ПРОСТОРОВИХ СТРУКТУР МОЛЕКУЛ ТУБУЛІНІВ ПАТОГЕННИХ ЧЕРВІВ

Гельмінтоз – це паразитарне захворювання, яке викликається різними видами паразитичних червів. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, сьогодні, понад 4,5 млрд. людей страждає від глистів та інших паразитів. За оцінкою Світового банку, економічні збитки від захворювань, викликаних кишковими гельмінтами посідає четверте місце серед усіх хвороб і травм.

У східній Європі захворюваність гельмінтозами в 10 разів вища захворюваності гострими кишковими інфекціями і за своєю частотою зіставна лише із показниками захворюваності на грип. Аскаридозом щорічно заражається близько 1,2 млрд. людей, анкілостомозом – у середньому 900 млн., трихоцефальозом – до 700 млн. Особливо несприятливі умови в країнах Східної Європи, де катастрофічна недооцінка проблеми, відсутність ефективної діагностики, доступних і безпечних антипаразитарних лікарських засобів призвели до практично поголового зараження населення гельмінтами. Загалом по Європі гельмінтоз діагностовано у кожного третього. На думку деяких фахівців, збудники паразитарних захворювань є у 85–90 % дорослого населення. В Україні було зареєстровано більш ніж 358000 випадків зараження паразитарними інфекціями. З них більш ніж 320000 осіб, інвазовані різними формами гельмінтозів, що складає 89,44 % від загального числа всіх виявлених випадків паразитарних інфекцій. При цьому 80 % ураженого населення складають діти віком до 14 років.

Інвазії паразитів призводить до розвитку імунодефіциту, алергічних поразок, хронізації запальних захворювань, зниження стійкості до бактеріальних і вірусних інфекцій. Майже всі паразити викликають слабкість, підвищену стомлюваність, сонливість, неясне мислення, запори, схуднення, інтоксикацію, кишкові розлади, метеоризм, загострюють і підтримують дисбактеріоз. Деякі гельмінтози (стронгілоїдоз) сьогодні розглядають як ВІЛ-асоційовані хвороби. Ризик канцерогенезу при деяких гельмінтозах,

що характеризуються вираженими проліферативними процесами в уражених органах (шистосомози, опісторхоз, клонорхоз), пов'язують саме з обтяжливим впливом паразитів на імунну систему «господаря». Класифікація гельмінтозів заснована головним чином на систематичному виді паразиту. Це надзвичайно велика група захворювань, проте вони об'єднуються схожими клінічними симптомами і підходами до лікування.

Практично завжди в програмах очищення організму від гельмінтів та інших паразитів застосовують спеціальні протиглисні препарати. Проте у присутніх на ринку препаратів існує істотний побічний ефект – висока токсичність. Саме тому, пошук нових протиглисних засобів, як і нових молекулярних мішеней на сьогодні все ще актуальний.

Мікротрубочки відповідають за мітотичний поділ еукаріотичних клітин і беруть участь у внутрішньоклітинних механізмах передачі сигналів за дії різних зовнішніх факторів біотичної та абіотичної природи. Також вони можуть безпосередньо і високо-специфічно взаємодіяти з рядом антимітотичних сполук різної хімічної природи.

Саме тому молекули α -, β - і γ -тубуліну є головними молекулярними мішенями для широкого спектра комерційно значущих препаратів, що використовуються як фунгіциди, гербіциди, протипухлинні, антипротозойні та протигельмінтні засоби. Ефект від такої специфічної взаємодії полягає у руйнуванні мікротрубочок або ж навпаки – їх незворотної фіксації. Тубуліни є мішенню для ряду протипухлинних препаратів, зокрема таких як Taxol® (стабілізація мікротрубочок) або вінбластин і вінкрестин, які блокують збирання мікротрубочок [1]. Як інші приклади такої специфічної взаємодії можна навести здатність колхіцину зв'язуватися з тубуліном і також зупиняти утворення мікротрубочок, завдяки чому ця речовина стала загальноживим засобом поліплоїдизації клітин

(перш за все у селекції), а при застосуванні як фармакологічний препарат колхіцин блокує нейтрофільні гранулоцити і зменшує подагричне запалення [2]. Протигрибковий препарат гризеофульвін також перешкоджає формуванню мікротрубочок та інколи використовується для лікування деяких типів злоякісних пухлин.

Оскільки тубуліни паразитичних червів людини, тварин, вищих рослин і грибів є перспективними мішенями для інгібіторів клітинного поділу цих патогенних організмів, то метою цієї роботи є створення бібліотеки цільових білків, що буде включати моделі молекул α -, β - і γ -тубулінів патогенних гелмінтів і може бути використана для *in silico* тестування нових речовин з антигельмінтною активністю [3].

Матеріали і методи

Первинні послідовності білків були отримані з онлайн бази даних UniProtKB [4]. Моделювання просторової структури білків здійснено за допомогою онлайн-сервера I-TASSER [5] в режимі автоматичного вибору матриці. Для всіх тривимірних моделей проведено оптимізацію їхньої геометрії в силовому полі amber 03 за допомогою пакету Gromacs [6].

Побудовані тривимірні моделі депоновано у базу даних CSModDB (<http://csmddb.ifbg.org.ua/comodore/index.php>) за відповідними інструкціями (<http://csmddb.ifbg.org.ua/docs/theoretical-models-submission>).

Результати та обговорення

Для заповнення бази даних віртуальної організації SCLabGrid моделями цитоскелетних білків було проведено пошук у базі даних «UniProtKB» (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) первинних послідовностей тубулінів патогенних червів із типів круглі та пласкі черви. Надалі за допомогою програм молекулярного моделювання (I-TASSER) і молекулярної динаміки (Gromacs) було здійснено реконструкцію просторових структур таких об'єктів:

- 105 α -тубулінів, з яких 73 належать паразитичним круглим червам (зокрема, таким видам, як *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Pristionchus pacificus*, *Strongyloides ratti*, *Ancylostoma ceylanicum*, *A. duodenale*, *Necator americanus*, *Oesophagostomum dentatum*, *Cooperia oncophora*, *Dictyocaulus viviparous*,

Haemonchus contortus, *Ostertagia ostertagi*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Trichuris suis*, *T. trichiura*, *Trichinella spiralis*), 32 – паразитичним плоским червам (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Hymenolepis diminuta*, *H. microstoma*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*);

- 170 β -тубулінів, з яких 127 тубулінів належать паразитичним круглим червам (*Ascaris suum*, *Parascaris equorum*, *Toxocara canis*, *Pristionchus pacificus*, *Strongyloides papillosus*, *Strongyloides ratti*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma caninum*, *A. ceylanicum*, *A. duodenale*, *Necator americanus*, *Oesophagostomum dentatum*, *Coronocylus coronatus*, *Cyathostomum catinatum*, *C. pateratum*, *Cylicocylus elongates*, *C. insigne*, *C. nassatus*, *Cylicocylus radiates*, *Cylicostephanus goldi*, *C. longibursatus*, *Cooperia oncophora*, *C. pectinata*, *Dictyocaulus viviparous*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Brugia malayi*, *B. pahangi*, *Dirofilaria immitis*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *O. gibsoni*, *Trichuris trichiura*, *Trichinella spiralis*), 43 – паразитичним плоским червам (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Moniezia expansa*, *Hymenolepis microstoma*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*);

- 27 γ -тубулінів, з яких 20 тубулінів належать паразитичним круглим червам (зокрема *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Pristionchus pacificus*, *Strongyloides ratti*, *Ancylostoma ceylanicum*, *Necator americanus*, *Oesophagostomum dentatum*, *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus contortus*, *Brugia malayi*, *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, *Wuchereria bancrofti*, *Trichuris suis*, *Trichinella spiralis*), 7 – паразитичним плоским червам (*Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis*, *Opisthorchis viverrini*, *S. haematobium*, *S. japonicum* та *S. mansoni*).

Побудовані моделі було депоновано у штатну базу даних CSModDB (**C**yto**S**keleton protein **M**odelling **D**ata**B**ase) віртуальної організації CSLabGrid. Інформація щодо зазначених вище протеїнів із зазначенням їх систематики та номерів послідовностей у базі Uniprot наведено у таблицях 1 та 2.

Таблиця 1. Інформація щодо послідовностей α -, β - та γ -тубулінів паразитичних круглих червів, які депоновано у CSModDB віртуальної організації CSLabGrid

Тип	Клас	Рід	Вид	α -тубуліни	β -тубуліни	γ -тубуліни
1	2	3	4	5	6	7
Nemathelminthes	Chromadorea	Ascaris	<i>A. suum</i>	trF1KXF3, trF1KYD4, trF1L005, trF1L5G6, trF1L5N0, trF1L243, trF1L868, trU1LQQ0, trU1MTN1, trU1NVK2, trU1NXZ9	trF1L4P8, trF1L5R2, trF1L7U3, trF1L8A5, trF1L602, trU1N9C8	trF1L4Z8
		Parascaris	<i>P. equorum</i>	-	trR4V0P8, trF8V4D1, trR4UY28, trR4VG92	-
		Toxocara	<i>T. canis</i>	trA0A0B2USJ3, trA0A0B2V1T0, trA0A0B2VB05, trA0A0B2VCZ7, trA0A0B2VEL7, trA0A0B2VM29, trA0A0B2VMD9, trA0A0B2VPL2	trA0A0B2V7F6, trA0A0B2VD78, A0A0B2VSH4, A0A0B2VUK1, A0A0B2VVA9, A0A0B2VX48	trA0A0B2W7D5
		Pristionchus	<i>P. pacificus</i>	trA0A0F5C9R0, trA0A0F5CL37, trH3DS34, trH3DVJ9, trH3EA41, trH3FKE6	trA0A0F5CJY5, trH3DZP2, trH3DZP3, trH3FHK9, trH3FHL0, trH3FHL1	trA0A0F5CVY5, trH3FT65
		Strongyloides	<i>S. papillosus</i>	-	trH6ABX4	-
			<i>S. ratti</i>	trA0A090KZQ8, trA0A090L4P2, trA0A090L7Q7, trA0A090LCB0, trA0A090LEN3, trA0A090LHX7, trA0A090MV29, trA0A090MYS4, trA0A090MZ67, trA0A090MZT1	trA0A090LEY9, trA0A090LGP8, trA0A090LM73, trA0A090N032, trQ4KS26	trA0A090MXR4
			<i>S. stercoralis</i>	-	trQ4KS25	-
		Ancylostoma	<i>A. caninum</i>	-	trB5AX19, trQ2QJK8	-
			<i>A. ceylanicum</i>	trA0A0D6LFM3, trA0A0D6LJF1	trA0A0D6LT74, trA0A016UP54, trA0A016WZQ2	trA0A0D6LL72, trA0A016SYM3, trA0A016SZV7
			<i>A. duodenale</i>	trA0A0C2DEB1, trA0A0C2FXX1, trA0A0C2GMW8, trA0A0C2H1N8, trA0A0C2HCI3	trA3FKG1, trQ4TV09	-
		Necator	<i>N. americanus</i>	trW2SMR5, trW2T416, trW2TAB1, trW2TV66	trA3FKG2, trW2T758, trW2TBE1, trW2TVB3	trW2T5V0
		Oesophagostomum	<i>O. dentatum</i>	trA0A0B1T1A5	trA0A0B1TTR0	trA0A0B1SMI2
		Coronocylcus	<i>C. coronatus</i>	-	trQ5ZPS3, trQ7KBQ4, trQ9GT35	-

1	2	3	4	5	6	7
Nematelminthes	Chromadorea	Cyathostomum	<i>C. catinatum</i>	-	trA8WEW6, trA8WEW7, trA8WEX2, trQ5ZPS2, trQ6BCK6, trQ6BCK7, trQ8MV64, trQ8MV65, trQ9GT34	-
			<i>C. pateratum</i>	-	trQ5ZPS4, trQ5ZPS5, trQ7KBQ5, trQ8MV66	-
		Cylicocycclus	<i>C. elongatus</i>	-	trQ8MV61, trQ8MV62	-
			<i>C. insigne</i>	-	trQ7KBP9, trQ8MV63	-
			<i>C. nassatus</i>	-	trA5CLH6, trA8WEW0, trA8WEX7, trA9LNN8, trQ6BCK5, trQ6BCK8, trQ7KBQ0, trQ7KHH8, trQ9GT32, trQ9GT33, trQ9N611, trQ66WT3	-
			<i>C. radiatus</i>	-	trQ7KBP8, trQ8MV60	-
		Cylicostephanus	<i>C. goldi</i>	-	trA9LNP7, trQ5ZPR8, trQ5ZPR9	-
			<i>C. longibursatus</i>	-	trA9LNP6, trA9LNQ8, trA9LNQ9, trQ5ZPS0	-
		Cooperia	<i>C. oncophora</i>	trH2BQ46	trQ6X2D7, trQ6X2D8	-
			<i>C. pectinata</i>	-	trA2TF57	-
		Dictyocaulus	<i>D. viviparus</i>	trA0A0D8XH20, trA0A0D8XMQ1, trA0A0D8Y057, trA0A0D8Y712	trA0A0D8XG65, trA0A0D8XGV3, trA0A0D8XHI2, trB0LJ60	trA0A0D8Y2M1
		Haemonchus	<i>H. contortus</i>	spP50719	trA2TF56, trC5J0J1, trC5J0J2, trC5J0J3, trC5J0J5, trC5J0J6, trC5J0J7, trC5J0J8, trC5J0J9, trC5J0K0, trQ9TX76, trQ25022, trQ25023, trQ25024, trQ25049, trR4X606, trU5F0E7	trU6PY42
		Ostertagia	<i>O. ostertagi</i>	trH2BQ47	trH2BQ48, trH2BQ49	-
		Teladorsagia	<i>T. circumcincta</i>	-	trQ26901	-
		Trichostrongylus	<i>T. colubriformis</i>	-	trH2B654	-
		Brugia	<i>B. malayi</i>	-	trQ66T51	trA8QGH2, trA0A024N128
			<i>B. pahangi</i>	-	spP18241	-
		Dirofilaria	<i>D. immitis</i>	-	trO61357	-
		Loa	<i>L. loa</i>	trE1FRH4, trJ0XE62, trJ0XJ53, trJ0XE42, trE1GGM8, trJ0DN53, trE1FP98	trJ0XJP5, trE1GBG1, trE1GI13, trE1G6C6, trE1FI78, trE1GF78	trE1FNC4
		Onchocerca	<i>O. volvulus</i>	trQ5BM24, trQ1I1D5	trO61358, trO61359	trA0A044SB54
			<i>O. gibsoni</i>	-	spP41387	-
		Wuchereria	<i>W. bancrofti</i>	trJ9EAA4	-	trJ9EHK8
		Trichuris	<i>T. suis</i>	trA0A085LUS0, trA0A085N579	-	trA0A085M8J1, trA0A085MM91
			<i>T. trichiura</i>	trA0A077Z355, trA0A077ZBW6, trA0A077ZI14	spO44388, trQ9U7Q1, trA0A077YV01, trA0A077ZJ06	-
		Trichinella	<i>T. spiralis</i>	trE5SAS0, trE5SCH9, trE5SSCI0, trE5SLF9	trE5SWF2	trE5SFY5

Таблиця 2. Інформація щодо послідовностей α -, β - та γ -тубулінів паразитичних плоских червів, які депоновано у CSMoDB віртуальної організації CSLabGrid

Тип	Клас	Рід	Вид	α -тубуліни	β -тубуліни	γ -тубуліни
Platyhelminthes	Cestoda	Echinococcus	<i>E. granulosus</i>	trA0A068WQW6, trA0A068WSE1, trA0A068WUS6, trA0A068WUT1, trA0A068X2V6, trW6V1B8	trU6JN6, trU6JM68, trU6JN59, trW6US08, trA0A068WEL5, trA0A068WIF6	A0A068WXL7, W6V5C9
			<i>E. multilocularis</i>	trA0A087VWS5, trA0A087VX71, trA0A087VX76	trA0A068Y7J6, trA0A068Y7X2, trA0A068YEW5, trA0A087VWR6, trA0A087VXD6, trA0A087W0X3, spQ9NFZ5, spQ9NFZ6, spQ9NFZ7	A0A068YIY8
		Moniezia	<i>M. expansa</i>	-	trH9B624	-
		Hymenolepis	<i>H. diminuta</i>	trQ8T672	-	-
			<i>H. microstoma</i>	trA0A068X5M2, trA0A068XI52, trA0A068XVW5, trA0A068XWS2	trA0A068X1F0, trA0A068X7K4, trA0A068XGN6, trA0A068XHQ8, trA0A068XHR6, trA0A068XL50, trA0A068XPD9	-
		Spirometra	<i>S. erinaceieuropaei</i>	trQ9NL73	trI6TL06	-
	Trematoda	Fasciola	<i>F. hepatica</i>	trB0B5G3, trB0B5G4, trB0B5G5, trB0B5G6, trB0B5G7	trB0B5G8, trB0B5G9, trB0B5H0, trB0B5H1, trB0RZ77, trB0RZ78, trB0RZ79	-
		Clonorchis	<i>C. sinensis</i>	trH2KTH2, trH2KTH3	trC6ZH72, trG7YFE9, trH2KQK9, trH2KQL0	-
		Opisthorchis	<i>O. viverrini</i>	-	-	A0A075A257
		Schistosoma	<i>S. haematobium</i>	trA0A094ZHX0, trA094ZQ50	trQ5FYA5	A0A094ZKM0
			<i>S. japonicum</i>	trC1LLC4, trC1LLC5	trC1LVE4, trQ7Z1I4	C1L471
	<i>S. mansoni</i>	trC4Q4S5, trG4V865, trG4VHT1, trG4VKY4, trQ26444, trQ26595	trC4QIC0, trG4LW34, trG4VHK8, trG4VTA4, trG4VTA5	G4V949		

Висновки

На підставі проведеного аналізу бази даних «UniProtKB» відібрано 302 амінокислотні послідовності α -, β - та γ -тубулінів із патогенних представників круглих та плоских червів: 105 α -тубулінів, 170 β -тубулінів і 27 γ -тубулінів та здійснено реконструкцію їх просторової структури. Побудовані моделі білків депоновано у базу даних CSMoDB (<http://csmoedb.ifbg.org.ua/comodore/index.php>). Створена бібліотека просторових структур молекул тубулінів паразитичних круглих та плоских червів є придатною для

використання при проведенні високопропускного віртуального скринінгу засобами ВО CSLabGrid.

Робота виконана в рамках проекту «Використання грид та напрацювань віртуальної організації CSLabGrid для високопропускного скринінгу інгібіторів тубуліну паразитичних червів» (№ держреєстрації 0115U004184) цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України: «Грид-інфраструктура і грид-технології для наукових і науково-прикладних застосувань».

Література

1. Weaver B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // *Mol Biol Cell*. – 2014. – V. 25 (18). – P. 2677–2681. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916.
2. Wang Y., Zhang H., Gigant B., Yu Y., Wu Y., Chen X., Lai Q., Yang Z., Chen Q., Yang J. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery // *FEBS J*. – 2016. – V. 283 (1). – P. 102–111. doi: 10.1111/febs.13555.
3. Карпов П.А., Брицун В.М., Раєвський О.В., Демчук О.М., Пидюра М.О., Ожерєдов С.П., Самофалова Д.О., Співак С.І., Ємець А.І., Кальченко В.І., Блюм Я.Б. Високопропускний скринінг речовин з антимітотичною активністю на базі віртуальної організації CSLabGrid // *Nauka innov*. – 2015. – V. 11 (1). – P. 92–100. <http://dx.doi.org/10.15407/scin11.01.092>.
4. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information // *Nucl. Acids Res*. – 2015. – V. 43 (D1). – P. D204–D212.
5. 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.
6. 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.

SPIVAK S.I., DEMCHUK O.M, KARPOV P.A., OZHEREDOV S.P., BLUM Ya.B.

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

THE LIBRARY OF SPATIAL STRUCTURE MODELS OF TUBULINS FROM PATHOGENIC WORMS

Aim. The aim of this work is to create library of pathogenic helminths tubulin 3D-models. Created models will be used as targets for *in silico* screening of new anthelmintic compounds. **Methods.** Tubulin sequences were obtained from UniProtKB database. Modeling of spatial structure of the proteins was performed using I-TASSER server. Optimization of three-dimensional models geometry was performed in Gromacs using amber03 force field. **Results.** Based on UniProtKB database analysis, 302 amino acid sequences of α - (105), β - (170) and γ -tubulins (27) of pathogenic worms were selected. 3D-models of selected proteins were built using base protocol. **Conclusions.** A built 3D models of pathogenic worms tubulins were deposited in CSMoDB (<http://csmoedb.ifbg.org.ua/comodore/index.php>) database. Created library of 3-D structures are suitable for further usage in VO CSLabGrid virtual screening for new compounds. **Keywords:** tubulin, pathogenic worms, database, Grid.