

КАРПОВ П.А.¹, СПІВАК С.І.^{1✉}, РАЄВСЬКИЙ О.В.¹, НИПОРКО О.Ю.², ОЖЕРЕДОВ С.П.¹, БЛЮМ Я.Б.¹

¹ Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: svetlana_spivak@ukr.net

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Україна, 01033, м. Київ, вул. Володимирська, 60, e-mail: dfnalex@gmail.com

✉ svetlana_spivak@ukr.net, (050) 159-00-57

ОЦІНКА СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ ВЗАЄМОДІЇ ГЛАЗІОВІАНІНУ А З α -, β - ТА γ -ТУБУЛІНАМИ ЛЮДИНИ

Мета. Визначення особливостей ліганд-білкової взаємодії глазіовіаніну А з молекулами α -, β - і γ -тубулінів людини. **Методи.** Моделювання просторової структури цільових білків (I-Tasser) і лігандів, молекулярний докінг (CCDC Gold), обрахунок молекулярної динаміки (GROMACS). **Результати.** За допомогою програмного пакета CCDC Gold було виконано молекулярний докінг глазіовіаніну А у сайт ГТФ/ГДФ α -/ β - і γ -тубуліну, а також у сайт зв'язування колхіцину. Отримані ліганд-білкові комплекси було досліджено із використанням молекулярної динаміки. **Висновки.** Показана здатність молекул тубуліну людини зв'язуватися з глазіовіаніном А, що дозволяє розглядати похідні цієї сполуки як перспективні ефектори тубуліну. Визначені показники енергій зв'язування ліганду і мішені підтверджують значно більшу афінність до молекул β -тубуліну, а також висунуто припущення, що зв'язування глазіовіаніну А з β -тубуліном може здійснюватися за двома альтернативними сайтами: 1) ГТФ/ГДФ-обмінним сайтом та 2) сайтом зв'язування колхіцину.

Ключові слова: тубулін, зв'язування, глазіовіанін А, протипухлинна активність.

Пошук та створення нових ефективних протипухлинних препаратів був і продовжує бути великим викликом для онкологів [1]. Зараз відома велика кількість препаратів, потенційно здатних пригнічувати ріст злоякісних клітин, проте лише одиниці були схвалені і застосовуються під час проведення різного типу хемотерапії [2]. Незважаючи на успіхи у галузі розробки засобів хіміотерапії раку, пошук нових агентів не припиняється. Зараз відома велика кількість молекулярних мішеней хіміотерапії, однак слід зазначити, що так або інакше усі вони

спрямовані на запобігання розмноження злоякісних клітин [3]. Тому зрозуміло, що в ряду об'єктів таргетної терапії раку саме білки клітинного поділу і (особливо білки мікротрубочок) є найважливішими молекулярними мішенями [4]. Використання сполук, які були б здатні діяти безпосередньо на мішені апарату поділу клітини (і в першу чергу на молекули γ -тубуліну центрів організації мікротрубочок (ЦОМТів)), здається нам найбільш обґрунтованим [5].

Мікротрубочки і центри організації мікротрубочок є ключовими компонентами цитоскелету еукаріот, що відіграють важливу роль у різноманітних клітинних процесах, зокрема таких, як мітоз, транспорт, полярність та підтримання форми клітин, внутрішньоклітинна міграція і сигналінг. Структурною одиницею мікротрубочок є гетеродимер α - і β -тубуліну. Так, у людини відомі 10 α -, 11 β - і 2 γ -ізотипів тубуліну, які кодуються окремими генами і відрізняються за рівнем експресії у різних органах і тканинах [5]. Мікротрубочковий цитоскелет є своєрідним «вузьким місцем» у відповіді еукаріотичної клітини на дію хімічних чинників. Внаслідок здатності специфічним чином зв'язувати низькомолекулярні сполуки різної природи молекули тубуліну є мішенями для широкого спектра речовин, котрі використовуються як фунгіциди, гербіциди, протипухлинні, антипротозойні та протигельмінтні засоби [5, 6].

Так, нещодавно з'явилися свідчення, що сполуки ізофлавонового ряду можуть взаємодіяти з різними ізотопами тубуліну [7, 8]. Ізофлавоноїди – привілейований клас гетероциклічних біологічно активних сполук, що з успіхом використовуються у клінічній практиці лікування різноманітних хвороб [9]. Загалом флавоноїди є одним із найбільших і найвивчених класів рослинних метаболітів фенілпропанового ряду,

© КАРПОВ П.А., СПІВАК С.І., РАЄВСЬКИЙ О.В., НИПОРКО О.Ю., ОЖЕРЕДОВ С.П., БЛЮМ Я.Б.

що на сьогоднішній день нараховує приблизно 10000 різноманітних похідних. За хімічною структурою канонічні флавоноїди складаються з двох основних груп: 2-фенілхромани (флавоноїди, у тому числі флаванони, флаволи, флавонолі, флаван-3-олі та антоціанідини) та 3-фенілхромани (ізофлавоноїди, включаючи ізофлаволи, ізофлаванони та птерокарпани) [9]. Загалом інформація стосовно похідних ізофлавонолу як модуляторів тубуліну досить безсистемна і розрізнена. Найважливіші дані вказують на те, що ці сполуки можуть мати механізм взаємодії з тубуліном, що значно відрізняється від дії існуючих модуляторів тубуліну (паклітаксел, доцетаксел, вінкрисдин і винбластин) [10]. Доведено що похідні ізофлавонолу – глазівіанін А і гатастатин можуть зв'язуватися із молекулами тубуліну людини і пригнічують ріст злоякісних пухлин [7, 8]. Зокрема, глазівіанін А специфічно зв'язувався з β -тубуліном і показав селективну цитотоксичну дію на прикладі 39-ти ліній пухлинних клітин [7]. Водночас сайт і структурні особливості взаємодії з різними ізотипами тубуліну залишаються невідомими.

Метою нашого дослідження було визначення особливостей ліганд-білкової взаємодії глазівіаніну А з молекулами α -, β - і γ -тубулінів людини.

Матеріали і методи

Повні амінокислотні послідовності тубулінів людини було отримано з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org/). За результатами PDB-blast пошуку було відібрано найближчі кристалографічні шаблонні структури, депоновані в RCSB Protein Data Bank (<http://rcsb.org>). Якість PDB-структур аналізували за допомогою програмного пакета «DeepView – Swiss-PdbViewer 4.0.3» (<http://www.expasy.org/spdbv/>). Моделювання структури білка за гомологією було виконано за допомогою пакета Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller/>) з використанням відібраних шаблонних структур з RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Було застосовано два профільні методи: 1) з використанням однієї матричної x-Ray структури (Modeller) і 2) з використанням ряду матриць згідно алгоритму сервера I-TASSER. Остаточну збірку моделей виконували за допомогою інструмента EasyModeller 4.0. Оцінку молекулярної динаміки моделі виконували у водному оточенні з використанням пакета GROMACS v. 4.5.5 і силового поля Charmm за температури

310 К з використанням термостату масштабування швидкостей та баростату Парінелло-Рамана. Протягом розрахунків молекулярної динаміки всіх реконструйованих структур α -, β - та γ -субодиниць тубуліну повідомлень про помилки не виникало, що є підтвердженням їх високої стеричної якості. Якість геометрії моделі була підтверджена за допомогою сервера ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) (www.protein.bio.puc.cl), програми ProCheck та сервера MolProbity. Остаточну перевірку виконували за допомогою Verify3D та наступних розрахунків обмеженої молекулярної динаміки в програмному середовищі Gromacs.

Оцінку молекулярної динаміки ліганд-білкових комплексів проводили з використанням пакета GROMACS (v. 4.5.5) за використанням силового поля charmm27 (www.charmm.org). Дані топології лігандів для силового поля charmm27 було отримано з бази даних SwissParam. Обрахунки виконували у водному оточенні (модулі «editconf» та «genbox»). Об'єм водного оточення генерувався автоматично. Дальні електростатичні взаємодії враховували за допомогою методу PME (Particle Mesh Ewald). Негативний заряд отриманих молекулярних систем нейтралізувався за допомогою модуля «genion» шляхом заміщення молекул води іонами натрію та хлору до відповідного рівня фізіологічної концентрації (0,15 Моль/л). Попередню оптимізацію геометрії молекулярних систем виконували шляхом мінімізації потенційної енергії («grompp» та «mdrun») із використанням алгоритму крутого спуску (steepest descent) за максимальної кількості кроків = 1000 і градієнтів = 0,1. Мінімізацію енергії також здійснювали з використанням силового поля charmm27.

Наступну процедуру обмеженої молекулярної динаміки (молекулярного рестрейнінгу) також проводили з використанням вище зазначених модулів за температури 310 К протягом 0,2 пс. Процес молекулярної динаміки тривалістю 50 нс здійснювали за допомогою модулів «grompp» та «mdrun». Для імітації об'єму розчинника було застосовано періодичні граничні умови. Температура системи підтримувалася на рівні 310 К за допомогою термостата Берендсе-на з часом взаємодії 0,1 пс. Постійний тиск підтримувався за допомогою функції зовнішнього баростата. Довжина зв'язків із участю атомів водню була зафіксована на рівноважному рівні за допомогою алгоритму Lincs. Аналіз результатів молекулярної динаміки комплексів ліганд-

білок здійснювали з використанням модуля «g_energy», який дозволяє здійснювати оцінку кулонівських (електростатичних) та Леннард-Джонсівських (LJ) взаємодій ліганду як в складі комплексу з білком, так і у вільному стані у водному оточенні.

Енергію зв'язування ліганду з білком обраховували за формулою:

$$\Delta G_{\text{bind}} = b(\langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_p - \langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_w) + v(\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_p - \langle V_{\text{L-s el}} \rangle_w) \quad [50]$$

де $\langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_p = \text{LJ}$ складова взаємодії ліганд/білок; $\langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_w = \text{LJ}$ складова взаємодії ліганд/вода; $\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_p = \text{електростатична}$ складова взаємодії ліганд/білок; $\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_w = \text{електростатична}$ складова взаємодії ліганд/вода. Значення коефіцієнтів були взяті за умовчанням та дорівнювали $b=0,18$ та $v=0,50$.

Для всіх отриманих комплексів було розраховано довготривалу молекулярну динаміку (інтервал 100 нс) в умовах, що імітують внутрішньоклітинні (періодичний водно-сольовий бокс). Розрахунки проводили в програмному середовищі GROMACS з використанням силового поля Charmm за температури 310 К з використанням термостата масштабування швидкостей та баростату Парінелло-Рамана.

Структурні зміни молекул тубулінів та їх комплексів аналізували за допомогою модулів g_rmsd та g_gyrate програмного забезпечення GROMACS. Енергію взаємодії розраховували за допомогою модуля g_energy. Аналіз структури контактних інтерфейсів між мішенню та лігандом до і після молекулярної динаміки здійснювали за допомогою програмного забезпечення (BIOVIA) Discovery Studio Visualizer 4.5. (<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization.html>).

Візуалізацію 3D-структур, структурне вивчення моделей, а також аналіз відповідних амінокислотних залишків здійснювали з використанням програмного пакета Accelrys (BIOVIA) Discovery Studio Visualizer 3.1 (Accelrys Software Inc. – <http://accelrys.com/>).

Результати та обговорення

Відомо, що глазівіанін А не має впливу на γ -тубулін, однак блокує контакти між гетеродимерами α/β -тубуліну. При цьому передбачається, що у випадку β -тубуліну його взаємодія з білком можлива як у сайті ГТФ/ГДФ, так і у сайті зв'язування колхіцину [7]. За допомогою

програмного пакета CCDC Gold було виконано молекулярний докінг глазівіаніну А у сайт ГТФ/ГДФ α/β - і γ -тубуліну, а також у сайт зв'язування колхіцину. Найкращі моделі ліганд-білкових комплексів відбирали на підставі візуальної оцінки занурення ліганду у кишеню сайту, якості контакту ліганду і амінокислотного оточення мішені, а також за сумарним показником оцінювальних функцій CCDC Gold.

На наступному етапі отримані ліганд-білкові комплекси було досліджено шляхом оцінки їх молекулярної динаміки. Середньоквадратичне відхилення (RMSD) атомів α -тубуліну та зміни радіусу гірації білка протягом 100 нс свідчать про потенційний дестабілізуючий вплив глазівіаніну А на молекулу α -тубуліну, що є непрямим доказом ліганд-залежної деконденсації білка і нестабільності комплексу. При цьому середнє значення енергії взаємодії з α -тубуліном становить -177,86 кДж/моль. Вільна енергія взаємодії між білком і лігандом за досліджуваним ансамблем складає -94,93 кДж/моль. Різке падіння енергії спостерігається протягом 24 нс, потім це значення виходить на плато, тримається (24–42 нс), після чого починає зростати. Наступні рівні енергії взаємодії набувають складного характеру без ознак стабілізації, що свідчить про нестабільність взаємодії з α -тубуліном, і супроводжуються значними перебудовами ГТФ-зв'язуючого сайту (рис. А). Таким чином, протягом 100 нс оцінки молекулярної динаміки дисоціація ліганду і білка не відбулася.

Аналогічна динаміка середньоквадратичного відхилення (RMSD) атомів β -тубуліну в комплексі з глазівіаніном А, зв'язаним у ГТФ-сайті, також свідчать про відсутність остаточної релаксації в структурі білка, проте зміни структури були більш плавними, без критичних і різких змін. Радіус гірації білка також виявляв тенденцію до плавного збільшення. Середнє значення енергії взаємодії між β -тубуліном та глазівіаніном А становить -554,08 кДж/моль. Вільна енергія взаємодії між білком і лігандом досліджуваного ансамблю становила 421,38 кДж/моль. Ці показники є найнижчими серед усіх досліджуваних комплексів і незаперечно свідчать про більшу енергетичну вигідність моделі взаємодії β -тубуліну і глазівіаніну А. Енергія взаємодії стабілізується практично на перших наносекундах молекулярної динаміки (рис. Б), а протягом останніх 20 нс проявляє тенденцію до подальшого зниження. В ході оцін-

ки молекулярної динаміки в сайті мішені також відбуваються певні зміни, проте вони є не настільки критичними, як у випадку α -тубуліну (рис. Б) Це цілком узгоджується з результатами експериментів з оцінки зв'язування глікозіваніну β -субодиницею тубуліну [7].

На відміну від ГТФ-сайту, у випадку приєднання глікозіваніну А до колхіцинового сайту комплекс релаксує, починаючи з ~ 50 нс молекулярної динаміки, що може свідчити на користь стабілізації структури β -тубуліну. Незважаючи на те, що радіус гірації β -тубуліну у випадку зв'язування глікозіваніну А в колхіциновому сайті проявляє тенденцію до збільшення, загалом воно не перевищує $0,2 \text{ \AA}$, що не є суттєвим у масштабі молекули білка.

Величини енергії зв'язування та вільної енергії зв'язування у випадку приєднання глікозіваніну А до колхіцинового сайту є дещо більшими у порівнянні з комплексом у ГТФ-сайті ($-489,69$ та $-220,95$ кДж/моль відповідно). Можливо, такий непропорційний ріст вільної енергії може бути пов'язаний із зниженням ентропії за взаємодії із сайтом колхіцину (рис. Г). Проте енергія зв'язування проявляє виражену тенденцію до подальшого зниження, особливо починаючи з 60 нс молекулярної динаміки, і, на на-

шу думку, ця тенденція може зберігатись і надалі.

Варто зазначити, що протягом молекулярної динаміки характер взаємодії глікозіваніну А з амінокислотним оточенням колхіцинового сайту істотно змінюється, що може свідчити про можливість пролонгованого підлаштування ліганду до сайту з подальшою фіксацією оптимальної конформації. Таким чином, у випадку β -тубуліну можна припустити існування двох альтернативних сайтів зв'язування глікозіваніну А: сайту ГТФ і сайту зв'язування таксолу.

Взаємодія глікозіваніну А з γ -тубуліном людини характеризується такими особливостями. Структура білка в складі комплексу практично релаксує протягом перших 48 нс молекулярної динаміки, а зменшення радіуса гірації підтверджує тенденцію до компактизації структури білка. В той самий час енергія взаємодії та вільна енергія взаємодії є суттєво більшими, ніж у випадку β -тубуліну ($-244,56$ та $-168,21$ кДж/моль), хоча й істотно нижчими, ніж у випадку комплексу з α -тубуліном. При цьому, енергія взаємодії невпинно зростає в міру перебігу молекулярної динаміки (рис. В) і особливо різко після 85 нс.

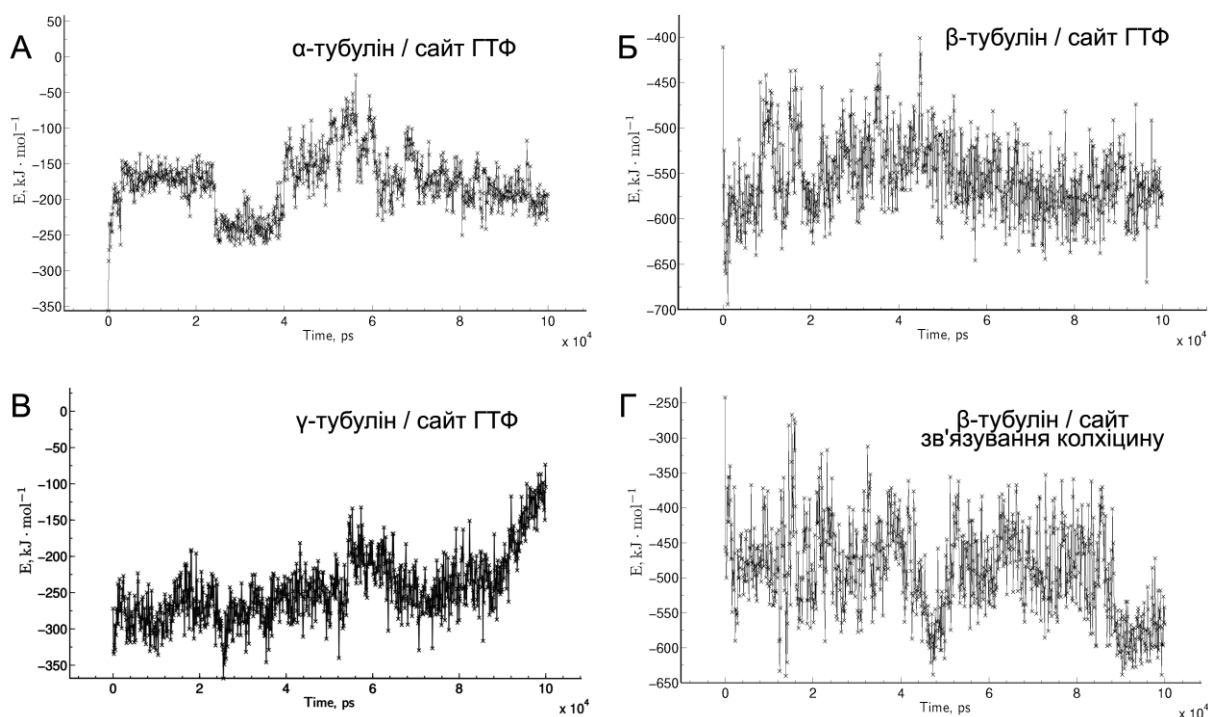


Рис. Динаміка енергії взаємодії ($E, \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) між α - (А), β - (Б, Г), γ -тубуліном (В) та глікозіваніном протягом 100 нс молекулярної динаміки: сайт ГТФ (А, Б, В) і сайт зв'язування колхіцину β -тубуліну (Г).

Порівняння амінокислотного оточення глазіовіаніну А на початку і наприкінці оціночного інтервалу молекулярної динаміки визначило поступову втрату ряду контактів у сайті взаємодії, що може бути ознакою невідворотної дисоціації комплексу глазіовіаніну А і γ -тубуліну.

Висновки

1. За результатами біоінформатичного дослідження підтверджена здатність молекул тубуліну людини зв'язувати глазіовіанін А, що дозволяє розглядати похідні цієї сполуки як перспективні ефектори тубуліну.

2. Встановлено, що глазіовіанін А здатен взаємодіяти з різними ізо типами тубуліну людини,

але визначені показники енергій зв'язування ліганду і мішені підтверджують його значно вищу спорідненість до молекул β -тубуліну.

3. Висунуто припущення, що зв'язування глазіовіаніну А з β -тубуліном може здійснюватися за двома альтернативними сайтами: 1) ГТФ/ГДФ-обмінним сайтом та 2) сайтом зв'язування колхіцину.

Дослідження було виконано за підтримки гранту Державного фонду фундаментальних досліджень України «Високопропускний скрінінг похідних ізофлавонолу та створення бібліотеки сполук – потенціальних ефекторів гамма-тубуліну людини із протипухлинною активністю» (№ Держреєстрації 0117U003753).

Література

- Hait W.N. Anticancer drug development: the grand challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010. Vol. 9. P. 253–254.
- Faucette S., Wagh S., Trivedi A., Venkatakrishnan K., Gupta N. Reverse translation of US Food and Drug Administration reviews of oncology new molecular entities approved in 2011–2017: Lessons learned for anticancer drug development. *Clin. Transl. Sci.* 2017. doi: 10.1111/cts.12527.
- Griffin R., Ramirez R.A. Molecular targets in non-small cell lung cancer. *Ochsner J.* 2017. Vol. 17. P. 388–392.
- Pasquier E., Kavallaris M. Microtubules: A dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*, 2008. Vol. 60 (3). P. 165–170.
- Karpov P.A., Bryrsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of virtual organization CSLabGrid. *Nauka innov.* 2015. Vol. 11. P. 92–100.
- Cao Y.N., Zheng L.L., Wang D., Liang X.X., Gao F., Zhou X.L. Recent advances in microtubule-stabilizing agents. *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 143. P. 806–828.
- Yokosuka A., Haraguchi M., Usui T., Kazami S., Osada H., Yamori T., Mimaki Y. Glaziovianin A, a new isoflavone, from the leaves of *Ateleia glazioviana* and its cytotoxic activity against human cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. Vol. 17. P. 3091–3094.
- Kobayashi M., Natsume T., Tamaoki S., Watanabe J., Asano H., Mikami T., Miyasaka K., Miyazaki K., Gondo M., Sakakibara K., Tsukagoshi S. Antitumor activity of TZT-1027, a novel dolastatin 10 derivative. *Jpn. J. Cancer Res.* 1997. Vol. 88. P. 316–327.
- Dixon R.A., Pasinetti G.M. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*. 2010. Vol. 154. P. 453–457.
- Torres F.C., García-Rubiño M.E., Lozano-López C., Kawano D.F., Eifler-Lima V.L., von Poser G.L., Campos J.M. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem.* 2015. Vol. 22. P. 1312–1323.

KARPOV P.A.¹, SPIVAK S.I.¹, RAEVSKY O.V.¹, NYPORKO O.Y.², OZHEREDOV S.P.¹, BLUME Y.B.¹

¹ Institute of Food Biotechnology and Genomics Nat. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: svetlana_spivak@ukr.net

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 01033, Kyiv, Volodimirskaya str., 60, e-mail: dfnalex@gmail.com

ASSESSMENT OF STRUCTURAL PECULIARITIES OF GLAZIOVIANIN A INTERACTION WITH HUMAN α -, β - AND γ -TUBULINS

Aim. To determine the features of the ligand-protein interaction of glaziovianin A and human α -, β - and γ -tubulin.

Methods. Protein and ligand spatial structure modelling (I-Tasser, Grid), molecular docking (CCDC Gold), molecular dynamics simulation (GROMACS). **Results.** Using the method of molecular docking in CCDC Gold ligand-protein complexes of glaziovianin A and human α -, β - and γ -tubulin were reconstructed. Studied ligand interactions in GTP/GDP-exchange and colchicine binding sites of different tubulin isotypes. The built ligand-protein complexes were studied using molecular dynamics simulations. **Conclusions.** Binding of glaziovianin A with human tubulin was confirmed exposing its derivatives as perspective tubulin effectors. The binding energies of ligand-protein interaction confirm higher affinity for β -tubulin molecules, and it was suggested that glaziovianin A binding may occur at two alternative sites: GTP/GDP-exchange site and site of colchicine binding.

Keywords: tubulin, glaziovianin A, binding, antitumor activity.