

**П.А. Карпов¹, В.М. Брицун², О.В. Раєвський¹,
О.М. Демчук¹, М.О. Пидюра¹, С.П. Ожерєдов¹, Д.О. Самофалова¹,
С.І. Співак¹, А.І. Ємець¹, В.І. Кальченко², Я.Б. Блюм¹**

¹ ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України», Київ

² Інститут органічної хімії НАН України, Київ

ВИСОКОПРОПУСКНИЙ СКРИНІНГ РЕЧОВИН З АНТИМІТОТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ НА БАЗІ ВІРТУАЛЬНОЇ ОРГАНІЗАЦІЇ CSLabGrid



Описано створення репозиторію 3-D моделей білків цитоскелету (тубулінів і FtsZ-білків) у рамках віртуальної організації CSLabGrid з використанням обчислень в Грід. Розглянуто питання створення репозиторію просторових структур канонічних антимікротрубочкових агентів (інгібіторів полімеризації тубуліну), а також бібліотеки речовин, придатних для віртуального молекулярного скринінгу в Грід. За результатами високопропускного віртуального скринінгу цієї бібліотеки відібрано 1164 речовини з підвищеною спорідненістю до тубуліну: 205 — до α -тубуліну і 959 — до β -тубуліну. Встановлено, що з 2886 сполук, синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України, 6 речовин є перспективними інгібіторами полімеризації α - і β -тубуліну з таких збудників хвороб людини, як *Pneumocystis carinii*, *Giardia intestinalis*, *Ajellomyces capsulatus*, *Neosartorya fumigata*, *Candida albicans*. Відповідно ці речовини рекомендовані для подальшої експериментальної оцінки їх біологічної активності з метою застосування як нових фармакологічних засобів.

Ключові слова: Грід, віртуальна організація, структурна біоінформатика, цитоскелет, тубулін, бензімідазольні сполуки, деполімеризація тубуліну, антимітотична активність, молекулярний докінг, високопропускний скринінг, фармакологічні засоби.

ВСТУП. ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Цитоскелет — це високодинамічна структура клітини, функціонування якої забезпечує процеси мітозу, мейозу, цитокінезу, підтримки і адаптації форми клітин, екзо- та ендоцитоз, рух клітини, активний транспорт тощо [1, 2]. У зв'язку з участю у найбільш фундаментальних процесах життєдіяльності клітини білки та макромолекулярні комплекси, що утворюють цитоскелетні структури (*мікротрубочки*, *мікрофіламенти* та *проміжні філаменти*), є важливими мішенями для різних класів при-

родних та синтетичних сполук [3]. Завдяки здатності молекул α - і β -тубуліну, які формують протофіламенти мікротрубочок, та їх бактеріальних гомологів — FtsZ-білків специфічним чином зв'язувати низькомолекулярні сполуки різної природи мікротрубочки є відповідальними за реакцію еукаріотичних клітин на дію різноманітних хімічних чинників [4–8]. Деякі з цих сполук зв'язуються з вільними мономерами тубуліну (*колхіцин*, *вінбластин* тощо) та перешкоджають їм полімеризуватись або, навпаки, взаємодіють з полімеризованими молекулами тубуліну, не допускаючи їх дисоціації на мономери (*таксол*) [9, 10]. Також існують речовини, що аналогічним чином діють і на актинові філаменти, стабілізуючи їх

© П.А. КАРПОВ, В.М. БРИЦУН, О.В. РАЄВСЬКИЙ,
О.М. ДЕМЧУК, М.О. ПИДЮРА, С.П. ОЖЕРЕДОВ,
Д.О. САМОФАЛОВА, С.І. СПІВАК, А.І. ЄМЕЦЬ,
В.І. КАЛЬЧЕНКО, Я.Б. БЛЮМ, 2015

(фаллоїдин) або запобігаючи полімеризації мономерів актину (*латрункулін*) [11].

Саме тому тубулін та його бактеріальний гомолог білок FtsZ, актин, бактеріальні білки MreB і PagM, білки проміжних філаментів і численна група білків, що безпосередньо з ними взаємодіють або беруть участь в регуляції їх структури шляхом різноманітних посттрансляційних модифікацій, є важливими мішенями для широкого спектру комерційно значимих препаратів (*протипухлинні, фунгіцидні, гербіцидні, антипротозойні, протигельмінні* та інші засоби). Крім того, дані білки є незамінними мішенями для створення низькомолекулярних агентів, які можуть використовуватись як інструменти дослідження молекулярних механізмів найбільш важливих і фундаментальних процесів народження, життя і смерті клітини [12–14].

Незважаючи на багаторічну історію дослідження цитоскелету із застосуванням методів біохімії, молекулярної біології, клітинної біології тощо, поглиблене розуміння основних структурно-молекулярних і клітинних механізмів функціонування цитоскелету стало формуватися лише в останні десятиріччя, що не в останню чергу пов'язано з розвитком і успіхами структурної біології та біоінформатики. Остання обставина пояснює проривні можливості структурно-біологічних досліджень цитоскелету *in silico*. Як приклад наведемо системні дослідження структури та функцій цитоскелету, розпочаті нашою групою більше 15 років тому. Успіх наших досліджень був обумовлений одночасним використанням обчислювальних та експериментальних методів.

Від початку утворення Українського Національного Грід стало зрозумілим, що наші методичні напрацювання щодо молекулярного моделювання, ідентифікації сайтів зв'язування лігандів на поверхні молекули білка та оцінки стабільності таких комплексів можуть бути з успіхом поєднані з технологіями розподілених обчислень на CPU, GPU, а також адаптовані до умов обрахунків у Грід [15–18]. Подібні дослі-

дження потребують значних обчислювальних ресурсів на етапах підготовки мішеней та бібліотек сполук, скринінгу, молекулярного докінгу і остаточної валідації комплексів з перспективними речовинами [15, 17]. Саме для вирішення обчислювальних задач, які виникають у ході вивчення цитоскелету, у 2011 р. на основі Грід-вузла Інституту харчової біотехнології і геноміки (ІХБГ) НАН України (<http://ifbg.org.ua>), була створена віртуальна організація (ВО) / лабораторія CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>; <http://www.youtube.com/user/CSLabGrid>) [19]. Головною метою ВО CSLabGrid є добровільне об'єднання фахівців і обчислювальних ресурсів із різних територіально (географічно) розмежованих установ для спільного вирішення наукових та прикладних задач у галузі молекулярно-біологічних та клітинно-біологічних досліджень цитоскелету як з використанням інструментів біології *in silico* (структурна біологія та біоінформатика), так і для вирішення задач, пов'язаних із використанням сучасних інструментальних досліджень (*електронна мікроскопія, лазерна конфокальна мікроскопія* тощо).

На сьогодні нами створено репозиторій 3-D моделей молекул ряду цитоскелетних білків еукаріот (тубулінів та білків, асоційованих з мікротрубочками) та прокаріотичних гомологів тубуліну – FtsZ-білків). Ці моделі були верифіковані за показниками стереохімічної коректності, якості упаковки, вірогідності укладки та результатів молекулярної динаміки. Також було створено відповідні бібліотеки анти-мікротрубочкових речовин, які належать до класів *бензімідазолів, фосфоротіоамідів, динітроанілінів та таксанів*. Існування вищезазначених бібліотек мішеней і лігандів дозволяє використовувати їх в обчислювальних експериментах, що виконуються і плануються на найближче майбутнє у рамках спільних досліджень учасниками віртуальної організації CSLabGrid (рис. 1, див. кольорову вклейку).

Найбільш показовим прикладом подібних віртуальних досліджень і реалізації програм-

них засад віртуальної організації CSLabGrid став масштабний експеримент з пошуку нових речовин з підвищеною спорідненістю до α - і β -тубулінів патогенних та шкідливих організмів. В результаті низки досліджень були встановлені специфічні сайти зв'язування антимікротрубочкових сполук різної хімічної природи на поверхні молекул α - і β -тубуліну, які характеризуються певною впорядкованістю свого просторового розташування та особливою топологією. Слід підкреслити, що певні відмінності первинної структури (амінокислотного складу) молекул тубуліну у представників різних таксономічних груп еукаріотів визначають певні структурні особливості цих сайтів, що є підґрунтям для молекулярного дизайну та скринінгу сполук з підвищеною спорідненістю до тубулінів патогенних організмів (*найпростіших, гриби, черв'яки* тощо) при водночас зниженій спорідненості до тубулінів людини. Саме ця наукова платформа була покладена в основу відбору потенційно біологічно активних хімічних сполук з бібліотеки речовин, синтезованих в Інституті органічної хімії (ІОХ) НАН України шляхом високопропускового молекулярного скринінгу із безпосереднім залученням обчислень у Грід та розроблених нами методів віртуальної оцінки здатності досліджуваних кандидатів взаємодіяти з молекулами тубуліну.

Поставлена задача вимагала підготовки бібліотеки цільових білків, яка включала б просторові моделі існуючих ізоформ тубуліну людини, а також моделі просторової структури молекул тубуліну патогенних організмів, таких, як різні представники патогенних найпростіших (*Protozoa*), збудники мікозів (*Microsporium*, *Epidermophyton*, *Trichophyton* тощо) та патогенні черв'яки (*Ascaridina*, *Trichurida*, *Cestoda*, *Digenaea*, *Enoplea* тощо). Вирішення задачі вимагало також ретельної ревізії існуючого репозиторію просторових структур білків-мішеней з Protein Data Bank (<ftp://ftp.wwpdb.org>) та реконструкції структур молекул тубулінів, які на час проведення експерименту були ще відсутні у репозиторії ВО CSLabGrid.

Використання саме Грід для виконання цього дослідження було цілком обґрунтованим у зв'язку з необхідністю обробки значного об'єму структурно-біологічної інформації. Так, лише у випадку тубулінів людини мова йде про 25 ізоформ тубуліну (10 ізоформ α -тубуліну, 11 – β - тубуліну, 2 – γ - тубуліну, 1 – δ -тубуліну і 1 – ϵ -тубуліну), що з врахуванням щонайменше чотирьох відомих сайтів зв'язування потребує залучення значних обчислювальних ресурсів на етапах підготовки структур (оптимізація, молекулярна динаміка), а також на етапах скринінгу, докінгу та молекулярної динаміки побудованих моделей ліганд-білкових комплексів.

ЗАГАЛЬНІ ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРІД-ВУЗЛА ДУ «ІХБГ НАН УКРАЇНИ»

До складу Грід-вузла на час виконання проекту входили:

- + 1 сервер HP ProLiant AV340A (2 × Intel Xeon E5504 Quad-Core (2.0GHz/4MB), 6 × 2 GB = 12 GB DDR3, 250 GB + 500 GB + 500 GB = 1,250 TB);
- + 1 сервер Supermicro SuperServer 6027R-TLF (2 × Intel Xeon E5-2650 (16 ядер, 32 потоки); 2 × 4 Gb DDR3-1333; 4 × 1000 GB SATA);
- + 9 серверів (Intel Xeon 3,2 ГГц – 36 ядер, RAM=2 Гб × 9 = 18) та 2 дискових сховища: Qnap TS-410 Turbo = 12 TB і Dell PowerEdge 1800 = 3 TB.

Пропускна здатність зовнішнього каналу зв'язку із іншими кластерами Національної мережі Грід (<http://ung.in.ua>) складає 10 Гбіт.

ПРОГРАМНА СКЛАДОВА ВО CSLABGRID

Для виконання завдань ВО CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>) на обчислювальному кластері ДУ «ІХБГ НАН України» було встановлено відповідне програмне забезпечення. Зокрема, це забезпечення включає програмні пакети для виконання молекулярного моделювання: I-TASSER 4.1 [20] і Modeller 9.11 [21]. Для виконання обрахунків задач молекулярної динаміки на кластері було

також встановлено програмні пакети Gromacs v.4.5.4; Gromacs v.4.5.5; NAMD v.2.8 і Amber Tools-1.5, а для високопропускового молекулярного скринінгу було використано програмний пакет UCSF DOCK 6.5 (<http://dock.compbio.ucsf.edu>) [22].

Остаточна оцінка речовин-лідерів здійснювалася на підставі оціночних функцій за результатами гнучкого докінгу в програмі CCDC GOLD 5.2 (www.ccdc.cam.ac.uk, локальні обчислення), а також за результатами обчислення молекулярної динаміки відібраних комплексів у Gromacs (обчислення в Грід). Калібрування системи для докінгу виконували на прикладі N-(3,5-диметоксифеніл)-3-[3-(3-метоксианіліно)-1H-1,2,4-тріазол-5-іл]піридин-2-аміну (SID 104060517, CHEM BL372849) і моделі α - тубуліну з бика (*Bos taurus*) [23].

ПІДГОТОВКА БІБЛІОТЕКИ РЕЧОВИН

Спільними зусиллями співробітників ІОХ НАН України та ІХБГ НАН було створено бібліотеку лігандів, що базується на колекції сполук імідазольного ряду, синтезованих раніше в ІОХ НАН України. Ці сполуки доступні для подальшої експериментальної перевірки. Наразі бібліотека (формати: *.sd, *.mol, *.mol2) нараховує 2886 індивідуальних сполук без урахування конформерів та стереоізомерів (> 5000 структур). Водночас за результатами скринінгу PubChem було підготовлено бібліотеку, що на сьогоднішній день нараховує 299 607 сполук (формати: *.sd, *.mol, *.mol2), які містять бензімідазольний фрагмент. Також 7 000 000 сполук було отримано з бази компанії AKos-Consulting & Solutions Deutschland GmbH (AKos GmbH – <http://www.akosgmbh.de>). Таким чином, після попередньої підготовки, повна бібліотека лігандів нараховувала 7 302 993 сполук.

Для підготовки бібліотеки лігандів і її скринінгу за допомогою програми UCSF DOCK 6.5 було використано програму OpenBabel, яка дає можливість автоматично додавати атоми водню до важких атомів та генерувати про-

сторову конформацію хімічних сполук. Завдяки програмі Marvin Bean було відфільтровано (у вигляді Smart записів) речовини, які містили реактивні групи-замісники (відібрані на основі фільтрів «*pan assay interference compounds*», складених за результатами досліджень).

Референтними (контрольними) речовинами слугували відібрані нами 170 сполук з відомою активністю проти α -тубуліну та 51 речовина з активністю проти β -тубуліну *B. taurus* [PDB: 4I4T]. Інформація про ці сполуки отримана з бази даних ChEMBL (www.ebi.ac.uk/chembl/), яка містить інформацію про 2D-структури біоактивних малих молекул. Були розраховані їх властивості (напр., logP, молекулярна маса, пошукові критерії відбору лігандів згідно з правилами *Ліпінського* тощо) і короткий опис біологічної активності (константи зв'язування, потенційні фармакологічні властивості, ADMET-дані тощо). Дані отримано з першоджерел у науковій літературі і перекривають значну частину сучасних препаратів.

Особливості роботи програм для докінгу та скринінгу вимагали певної обробки створеної бази сполук та референтних речовин. Речовини були переведені в бібліотеку 3D-структур і збережені у форматі *.mol2 з врахуванням парціальних зарядів, розрахованих за методом Gasteiger-Huckel [22]. Для цього використовували модуль Calculator пакету ChemAxon (<http://www.chemaxon.com/products/calculator-plugins/>) з функцією призначення *pH* (6,5–7,5) для створення різного рівня іонізації.

ПІДГОТОВКА 3D-МОДЕЛЕЙ ТУБУЛІНІВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКІНГУ ТА СКРИНІНГУ

У рамках програми створення бібліотеки білків та лігандів за допомогою пакета профільного молекулярного моделювання Modeller 9.11 [21] було побудовано тривимірні моделі 85-и ізоформ α -, β -, γ -, ϵ -тубулінів патогенних організмів. Із них 40 структур належать до α - і β -тубулінів:
 α -тубуліни: TBA_TRYCR (Q27352) із *Trypanosoma cruzi* (збудник африканського три-

паносомозу або сонної хвороби); TBA_TRYBR (P04106) із *Trypanosoma brucei rhodesiense* (збудник африканського трипаносомозу); TBA_TOXGO (P10873) із *Toxoplasma gondii* (збудник токсоплазмозу); TBA1_NAEGR (P11237) із *Naegleria gruberi* (збудник амебного менінгоенцефаліту); TBA_PLAFK (P14642) із *Plasmodium falciparum* (збудник малярії у людини); TBA_PLAYO (P12543) із *Plasmodium yoelii* (збудник малярії у інших ссавців); TBA1_ENTHI (P31017) із *Entamoeba histolytica* (збудник дизентерії); TBA1_PNECA (P53372) із *Pneumocystis carinii* (збудник пневмонії); TBA_CANAX (P87066) із *Candida albicans* (збудник кандидозу або молочниці); TBA_ENCCU (Q8SRI6) із *Encephalitozoon cuniculi* (збудник мікроспоридіозу); TBA_NEOCA (Q71G51) із *Neospora caninum* (збудник неоспорозу); TBA2_EMENI (P24634) із *Emericella nidulans* (конідиальна стадія *Aspergillus nidulans*) (збудник аспрегільозу або пліснявого мікозу); TBA_AJESA (P53371) із *Ajellomyces capsulatus* (конідиальна стадія *Histoplasma capsulatum*) (збудник гістоплазмозу); TBA1_CHLRE (P09204) із *Chlamydomonas reinhardtii*; TBA_HAECO (P50719) із *Haemonchus contortus* (нематода, збудник анкілостомозу); TBA_LEPDS (Q8WQ47) із *Lepidoglyphus destructor* (кліщ, збудник гліцифазозу або сінної сверблячки).

β-тубуліни: TBB_TRYCR (P08562) із *Trypanosoma cruzi*; TBB_TRYBR (P04107) із *Trypanosoma brucei rhodesiense*; TBB_TOXGO (P10878) із *Toxoplasma gondii*; TBB_PLAFA (P14140) із *Plasmodium falciparum*; TBB_PLAFK (P14643) із *Plasmodium falciparum* (isolate K1); TBB_PLAF7 (Q7KQL5) із *Plasmodium falciparum* (isolate 3D7); TBB_PNECA (P24637) із *Pneumocystis carinii*; TBB_CANAX (P10875) із *Candida albicans*; TBB_ENCCU (Q8SS99) із *Encephalitozoon cuniculi* (strain GB-M1); TBB_ENCIN (Q9GSR5) із *Encephalitozoon intestinalis* (збудник мікроспоридіозу); TBB2_ECHMU (Q9NFZ6) із *Echinococcus multilocularis*; TBB_GIAIN (P05304) із *Giardia intestinalis* (збудник лямбліозу); TBB_LEIME (P21148) із *Le-*

ishmania mexicana (збудник лейшманіозу); TBB_BABBO (Q04709) із *Babesia bovis* (збудник бабезіозу); TBB2_EMENI (P10874) із *Emericella nidulans*; TBB_AJESA (P41742) із *Ajellomyces capsulatus*; TBB_ASPFU (Q4WA70) із *Neosartorya fumigata* (strain ATCC MYA-4609 / Af293 / CBS 101355 / FGSC A1100) (конідиальна стадія *Aspergillus fumigatus*) (збудник аспрегільозу або пліснявого мікозу); TBB_CHLRE (P04690) із TBB_ENCHE (Q24829) із *Encephalitozoon hellem* (збудник мікроспоридіозу); *Chlamydomonas reinhardtii*; TBB1_BRUPA (P18241) із *Brugia pahangi* (нематода, збудник філяріозу); TBB_ONCGI (P41387) із *Onchocerca gibsoni* (нематода, збудник філяріозу); TBB_TRITR (O44388) із *Trichuris trichiura* (кільчатий черв'як, збудник трихиуріазу); TBB3_ECHMU (Q9NFZ5) із *Echinococcus multilocularis* (стрічковий черв'як, збудник альвеококозу); TBB1_ECHMU (Q9NFZ7) із *Echinococcus multilocularis*.

Основною матрицею для побудови 3D-моделей тубулінів була кристалічна структура молекули тубуліну із *B. taurus*. Наступну релаксацію отриманих промоделей виконували за допомогою методу молекулярної динаміки у водному оточенні з використанням програмного пакету Gromacs.

Наступним кроком було порівняння між собою всіх тубулінів. Необхідність такої дії обґрунтована великою подібністю не консервативних білків, а найбільш важливих сайтів зв'язування лігандів молекулами цих білків. Водночас результати хемоінформаційного аналізу виявили перекриття структур деяких хімічних сполук, що здатні інгібувати тубуліни різних видів. За допомогою пакету PyMol (<http://www.pymol.org/>) було виконано просторове вирівнювання оптимізованих структур тубулінів різних видів та визначено кластери за подібністю сайтів зв'язування. Таким чином, група α-тубулінів сформувала кластер із 6-и типів цільових білків, а група β-тубулінів – 3 кластери мішеней. Кожна з типових моделей мала мінімум 5–6 білків з ідентичним за

послідовністю або за просторовою структурою сайтом зв'язування.

СКРИНІНГ БІБЛІОТЕК СПОЛУК З ВИКОРИСТАННЯМ ВСТАНОВЛЕНОГО НА ГРІД-КЛАСТЕРІ ІХБГ НАН УКРАЇНИ ПРОГРАМНОГО ПАКЕТУ UCSF DOCK 6.5.

Оскільки віртуальний скринінг – це обчислювальна процедура, котра передбачає автоматизований перегляд бази даних хімічних сполук з наступним відбором тих із них, для яких прогнозується наявність заданих властивостей. Для здійснення віртуального скринінгу у BO CSLabGrid нами було обрано підхід, заснований на використанні молекулярного докінгу. Це дозволило передбачити просторову будову комплексу «ліганд–білок» і, враховуючи відповідні оціночні функції, розрахувати енергію зв'язування ліганда із білком. Саме тому для скринінгу було використано пакет UCSF DOCK 6.5. Цей вибір був обумовлений наявністю версії програми для UNIX, а також наявністю частково візуального інтерфейсу (Chimeа), що забезпечує зручність подальшого аналізу. На відміну від багатьох інших програм після підготовки молекули білка у програмному пакеті UCSF DOCK відбувається розрахунок поверхні білка, при цьому алгоритм для розрахунку водного оточення (радіусом 1,4 Å) зондує білок і будує нормаль (пряма, перпендикулярна поверхні білка) по відношенню до кожної точки поверхні.

Згідно з алгоритмом DOCK на наступному етапі були згенеровані сфери з центрами в точках розташування відповідних атомів, а також в місцях перекриття цих сфер. Ґрунтуючись на координатах ліганду або у відсутності інгібітора сайт автоматично заповнюється сферами різного діаметру, щоб якомога щільніше закрити простір. У свою чергу розміри сфер відповідали ван-дер-Ваальсовим радіусам основних елементів. Для зручності сфери були представлені кластерами за розмірами, що дозволило кластеризувати їх та визначити основне положення майбутнього інгібітора. На підставі отриманих даних була побудована сітка –

енергетична карта сайту зв'язування, для кожної точки якої були розраховані відповідні електростатична і ван-дер-Ваальсова енергії.

Під час виконання остаточної постановки експерименту в Грід використовували рецептор з атомами водню на всіх важких атомах, що дозволяло виконувати оцінку енергій взаємодії, ґрунтуючись на їх рівнянні, а саме оціночній функції енергії ліганд білкової взаємодії – «grid score» (E_{Grid}):

$$E_{\text{Grid}} = E_{\text{vdW}} + E_{\text{es}},$$

де E_{Grid} – «grid score» енергії взаємодії; E_{vdW} – енергії ван-дер-Ваальсових взаємодій; E_{es} – енергії електростатичних взаємодій.

Взагалі, функція E_{Grid} діє подібно до функції оцінки молекулярно-механічної енергії, але враховує виключно ентальпійну складову (тобто комплексну взаємодію з водним оточенням). За результатом обрахунку «grid score» програма автоматично з'ясовує в структурі ліганда найбільш жорстку і нерухому частину, і цей якір фіксується у найбільш енергетично вигідному положенні молекули, а решта радикалів обирається відносно якірного фрагменту з поетапним аналізом кожного з положень. Після цього жорсткий фрагмент переміщується в інше положення, і такий аналіз повторюється 200 разів. Відповідні збіги атомів ліганду зі сферами та результати розрахунку взаємодії дозволяють оцінити спорідненість лігандів до цільових білків. Результати аналізу розташування водневих зв'язків допомогли визначити ключові залишки та підготувати остаточні карти для молекулярного скринінгу за алгоритмом UCSF DOCK.

За результатами віртуального скринінгу загальної бібліотеки лігандів було відібрано 1 164 сполук-лідерів, які потенційно здатні блокувати полімеризацію тубуліну: 205 сполук-кандидатів для α -тубуліну і 959 – для β -тубуліну.

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДОКІНГ З ВИКОРИСТАННЯМ ГЕНЕТИЧНОГО АЛГОРИТМУ ПРОГРАМИ CCDC GOLD

Аналіз результатів молекулярного скринінгу дозволив відібрати 50 речовин-лідерів, які

за показником «grid score» потенційно здатні інгібувати тубуліни обох типів (α і β). Наступний етап молекулярного докінгу проводили на локальному комп'ютері з використанням генетичного алгоритму програми CCDC Gold. Використання цього алгоритму дозволило здійснити остаточний відбір найбільш перспективних сполук на підставі розрахунку показників енергії зв'язування та наявності і кількості водневих зв'язків. Для контролю докінгу була використана кристалографічна модель структури α -тубуліну з *B. taurus*. Для калібрування системи і контролю докінгу використовували модель контрольної речовини – N-(3,5-диметоксифеніл)-3-[3-(3-метоксианіліно)-1H-1,2,4-тріазол-5-іл]піридин-2-аміну, для якої доведена здатність пригнічувати полімеризацію тубуліну з *B. taurus* на 80 % [23] (рис. 2, див. кольорову вклейку). Також для відпрацювання протоколу докінгу було побудовано комплекси з двома іншими інгібіторами: подофілотоксин (CHE MBL61 – (5R,5aR,8aR,9R)-5-гідрокси-9-(3,4,5-триметоксифеніл)-5a,6,8a,9-тетрагідро-5H-[2]бензофурано[5,6-ф][1,3] бензодіоксол-8-он) та CHEMBL409088 ([2-(3-гідрокси-4-метоксифеніл)-6-метокси-1-бензофуран-3-іл]-(3,4,5-триметоксифенілметанон), що мають експериментально доведену спорідненість до ГТФ-обмінного сайту тубуліну та інгібують його активність на рівні 84 та 80 % відповідно (рис. 3, див. кольорову вклейку).

Розрахунок за генетичним алгоритмом відбувається через створення «популяцій» – це кількість випадково згенерованих конформацій, між якими відбувається «схрещування». Якщо нова конформація буде кращою, то залишиться в генфонді і братиме участь у новому схрещуванні. Для поділу створених результатів за групами використовують острови. За результатами докінгу контрольних сполук нами були обрані такі параметри докінгу: розмір популяції 100, 1,1 для вибірки, 10 островів, генетичних операцій 100 000. Радіуси VDW (van der Waals forces) і водневих зв'язків було встановлено на відстані 4,0 і 2,5 Å відповідно. Відбір найбільш перспективних кон-

формацій здійснювали на підставі оціночного критерію Gold Score. Для підвищення якості пошуку також враховували показники ChemScore і ASP. Радіус пошуку в сайті зв'язування складав 9 Å і був заданий згідно з рекомендацією CCDC. За аналогічним протоколом було виконано подальший докінг контрольних сполук і 50-ти речовин-лідерів на моделях молекул тубулінів патогенних організмів і контрольною структурою α -тубуліну з *B. taurus*.

При порівнянні результатів докінгу було визначено 10 лігандів, які мають потенційну активність проти α -тубулінів, та 7 проти β -тубулінів. Особливу увагу заслуговують 6 речовин, які за даними віртуального скринінгу в Грід (UCSF DOCK 6) і докінгу в CCDC Gold проявили значну спорідненість до α - і β -тубулінів з *Ajellomyces capsulatus*, *Pneumocystis carinii*, *Neosartorya fumigata*, *Candida albicans* і *Giardia intestinalis* (рис. 4, див. кольорову вклейку):

4-[(5-метансульфоніл-2-нітрофеніл)аміно]бутаноат – *A. capsulatus* (α -тубулін);

1-феніл-2-(1H-1,2,4-тріазол-3-ілсульфаніл)етан-1-он – *C. trachomatis* (α -тубулін);

4-хлор-3-[(2-гідроіксиетил)(метил)сульфамойл]бензоат – *P. carinii* (α -тубулін);

3-{[4-(4-хлофеніл)-5-(піридин-3-іл)-4H-1,2,4-тріазол-3-іл]сульфаніл}пропаноат – *N. fumigata* (β -тубулін);

2-[(2-(4-метосифеніл)-2-оксоетил)сульфоніл]бензоат – *C. albicans* (β -тубулін);

5-[(фуран-2-іл-метил)сульфамойл]-2-метоксибензоат – *G. intestinalis* (β -тубулін).

Вищезазначені речовини входять до групи сполук, синтезованих в ІОХ НАН України і в даний час знаходяться на стадії подальшої експериментальної перевірки в дослідах *in vitro* як інгібітори полімеризації мікротрубочок (тубуліну) для подальшого вивчення можливостей їх застосування як потенційних лікарських препаратів у боротьбі з інфекційними та паразитарними захворюваннями.

ВИСНОВКИ

За результатами високопропускового молекулярного скринінгу у Грід з бібліотеки, що

нараховувала 7 302 993 сполук, було відібрано 1 164 сполуки, які за даними дослідження мають спорідненість до молекул тубуліну різного походження: 205 – до α -тубуліну і 959 – до β -тубуліну. Крім того, з 2986 сполук, що були надані Інститутом органічної хімії НАН України і зараз доступні для експериментальної перевірки як перспективні інгібітори полімеризації тубуліну, було відібрано 6 речовин-лідерів, які згідно з даними молекулярного докінгу і скринінгу мають значну спорідненість до відповідних сайтів зв'язування на поверхні молекул α - і β -тубулінів з *Ajellomyces capsulatus*, *Chlamydia trachomatis*, *Pneumocystis carinii*, *Neosartorya fumigata*, *Candida albicans* і *Giardia intestinalis*.

Дослідження було підтримано грантом Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування Грід-технологій на 2009–2013 рр.: № 15: «Застосування Грід-ресурсу для біоінформаційного вивчення цитоскелету та високопропускного віртуального скринінгу речовин з антимікротрубочковою активністю для потреб фармацевтики та захисту рослин» (2010–2013 рр.), № 0113U004047 «Використання Грід для високопропускного скринінгу біологічно активних речовин з підвищеною спорідненістю до тубулінів як базової складової реалізації програмних засад віртуальної організації CSLabGrid» (2013 р.).

ЛІТЕРАТУРА

- Vignaud T., Blanchoin L., Théry M. Directed cytoskeleton self-organization // Trends Cell Biol. – 2012. – V. 22, N 12. – P. 671–682.
- Eren E.C., Gautam N., Dixit R. Computer simulation and mathematical models of the noncentrosomal plant cortical microtubule cytoskeleton // Cytoskeleton. – 2012. – V. 69, N 3. – P. 144–154.
- Massarotti A., Theeramunkong S., Mesenzani O. et al. Identification of novel antitubulin agents by using a virtual screening approach based on a 7-point pharmacophore model of the tubulin colchi-site // Chem. Biol. Drug Des. – 2011. – V. 78, N 6. – P. 913–922.
- Sui M., Zhang H., Di X. et al. G2 checkpoint abrogator abates the antagonistic interaction between antimicrotubule drugs and radiation therapy // Radiother. Oncol. – 2012. – V. 104, N 2. – P. 243–248.
- Henriquez F.L., Ingram P.R., Muench S.P. et al. Molecular basis for resistance of acanthamoeba tubulins to all major classes of antitubulin compounds // Antimicrob Agents Chemother. – 2008. – V. 52, N 3. – P. 1133–1135.
- Zhao Y., Wu F., Wang Y. et al. Inhibitory action of chamejasmin A against human HEP-2 epithelial cells: effect on tubulin protein // Mol Biol Rep. – 2012. – V. 39, N 12. – P. 11105–11112.
- Pilhofer M., Jensen G.J. The bacterial cytoskeleton: more than twisted filaments // Curr Opin Cell Biol. – 2013. – V. 25. – P. 125–133.
- Haglund C.M., Welch M.D. Pathogens and polymers: microbe-host interactions illuminate the cytoskeleton // J. Cell Biol. – 2011. – V. 195, N 1. – P. 7–17.
- Tuszynski J.A., Craddock T.J., Mane J.Y. et al. Modeling the yew tree tubulin and a comparison of its interaction with paclitaxel to human tubulin // Pharm Res. – 2012. – V. 29, N 11. – P. 3007–3021.
- Calvo E., Barasoain I., Matesanz R. et al. Cyclostreptin derivatives specifically target cellular tubulin and further map the paclitaxel site // Biochemistry. – 2012. – V. 51, N 1. – P. 329–341.
- Sørensen P.M., Iacob R.E., Fritzsche M. et al. The natural product cucurbitacin E inhibits depolymerization of actin filaments // ACS Chem Biol. – 2012. – V. 7, N 9. – P. 1502–1508.
- Desouza M., Gunning P.W., Stehn J.R. The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis // Bioarchitecture. – 2012. – V. 2, N 3. – P. 75–87.
- Anderson-White B., Beck J.R., Chen C.T. et al. Cytoskeleton assembly in *Toxoplasma gondii* cell division // Int Rev Cell Mol Biol. – 2012. – V. 298. – P. 1–31.
- Pei W., Du F., Zhang Y., He T., Ren H. Control of the actin cytoskeleton in root hair development // Plant Sci. – 2012. – V. 187. – P. 10–18.
- Demchuk O., Karpov P., Blume Ya. Docking small ligands to molecule of the plant FtsZ protein: Application of the CUDA technology for faster computations // Cytol. Genetics. – 2012. – V. 46, N 3. – P. 172–179.
- Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Hybrid CPU-GPU calculations – a promising future for computational biology // Third Int. Conference «High Performance Computing» HPC-UA 2013, October 7–11, 2013, Ukraine, Kyiv. – V. 2013a. – P. 330–335.
- Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Hardware environment for CSLabGrid: Reaching maximum efficacy of computations in structural biology and bioinformatics // Second Int. Conference «Cluster Computing» CC 2013 (Ukraine, Lviv, June 3–5, 2013), Ukraine, Lviv; 06/2013b. – P. 191–194.

18. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. On the efficiency of CPU and hybrid CPU-GPU systems in computational biology tasks // *Comput. Sci. Applicat.* — 2014. — V. 1, N 1. — P. 48–59.
19. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Design of specific cytoskeleton related biological database and data management environment for bioinformatical cytoskeleton investigation and collaboration within virtual Grid-organisation // *Proc. of the Int. Moscow Conference on Comput. Mol. Biol. (MCCMB'11)*. July 21–24, — 2011, Moscow, RF. — P. 297–298.
20. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // *Nature Protocols.* — 2010. — V. 5. — P. 725–738.
21. Webb B., Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER // *Curr Protoc Bioinformatics.* — 2014. — V. 47. — P. 5.6.1–5.6.32.
22. Tsai K.C., Wang S.H., Hsiao N.W. et al. The effect of different electrostatic potentials on docking accuracy: a case study using DOCK5.4. // *Bioorg Med Chem Lett.* — 2008. — V. 18, N 12. — P. 3509–3512.
23. Ouyang X., Chen X., Piatnitski E.L. et al. Synthesis and structure-activity relationships of 1,2,4-triazoles as a novel class of potent tubulin polymerization inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* — 2005. — V. 15. — P. 5154–5159.

П.А. Карпов¹, В.Н. Брицун², О.В. Раевский¹,
О.Н. Демчук¹, Н.А. Пыдиюра¹, С.П. Ожередов¹,
Д.А. Самофалова¹, С.И. Спивак¹, А.И. Емец¹,
В.И. Кальченко², Я.Б. Блюм¹

¹ ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики
НАН Украины», Киев

² Институт органической химии НАН Украины, Киев

ВЫСОКОПРОПУСКНОЙ СКРИНИНГ ВЕЩЕСТВ С АНТИМИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА БАЗЕ ВИРТУАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ CSLabGrid

Описано создание репозитория 3-D моделей белков цитоскелета (тубулинов и FtsZ-белков) в рамках виртуальной организации CSLabGrid с использованием вычислений в Грид. Рассмотрен вопрос создания репозитория пространственных структур канонических антимикротрубочковых агентов (ингибиторов полимеризации тубулина), а также библиотеки веществ, пригодных для виртуального молекулярного скрининга в Грид. В соответствии с результатами высокопропускного виртуального скрининга этой библиотеки отобрано 1164 вещества с повышенным сродством к тубулину: 205 – к α -тубулину и 959 – к β -тубулину. Установлено, что из 2 886

соединений, синтезированных в Институте органической химии НАН Украины, 6 веществ являются перспективными ингибиторами полимеризации α - и β -тубулина из таких возбудителей болезней человека, как *Pneumocystis carinii*, *Giardia intestinalis*, *Ajellomyces capsulatus*, *Neosartorya fumigata*, *Candida albicans*. Соответственно, эти вещества рекомендованы для дальнейшей экспериментальной оценки их биологической активности с целью использования в качестве новых фармакологических средств.

Ключевые слова: Грид, виртуальная организация, структурная биоинформатика, цитоскелет, тубулин, бензимидазольные соединения, деполимеризация тубулина, антимитотическая активность, молекулярный докинг, высокопропускной скрининг, фармакологические средства.

П.А. Карпов¹, В.М. Brytsun², А.В. Rayevsky¹,
О.М. Demchuk¹, N.O. Pydiura¹, S.P. Ozheredov¹,
D.A. Samofalova¹, S.I. Spivak¹, A.I. Yemets¹,
V.I. Kalchenko², Ya.B. Blume¹

¹ SO «Institute of Food Biotechnology and Genomics,
NAS of Ukraine», Kyiv

² Institute of Organic Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv

HIGH-THROUGHPUT SCREENING OF NEW ANTIMITOTIC COMPOUNDS BASED ON POTENTIAL OF VIRTUAL ORGANIZATION CSLabGrid

In the frameworks of virtual organization CSLabGrid using Grid calculations the repository of 3-D models of cytoskeletal proteins (tubulins and FtsZ-proteins) verified by stereochemistry, is described. The repository of structures of canonical antimicrotubular compounds (inhibitors of tubulin polymerization) as well as library of ligands, suitable for high-throughput screening (HTS) in Grid were created. According to the results of the library HTS 1,164 compounds that demonstrated an elevated affinity to tubulin molecules: 205 – to α -tubulin and 959 – to β -tubulin were selected. It was found that among 2,886 compounds synthesized in the Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine, 6 were perspective inhibitors of α - and β -tubulin polymerization in such human pathogens as *Pneumocystis carinii*, *Giardia intestinalis*, *Ajellomyces capsulatus*, *Neosartorya fumigata* and *Candida albicans*. Respectively, these compounds were recommended for subsequent experimental evaluation of their biological activity for use as new pharmacological agents.

Key words: Grid, virtual organization, structural bioinformatics, cytoskeleton, tubulin, benzimidazole compounds, tubulin depolymerization, antimitotic activity, molecular docking, high-throughput screening, drugs.

Стаття надійшла до редакції 08.11.14

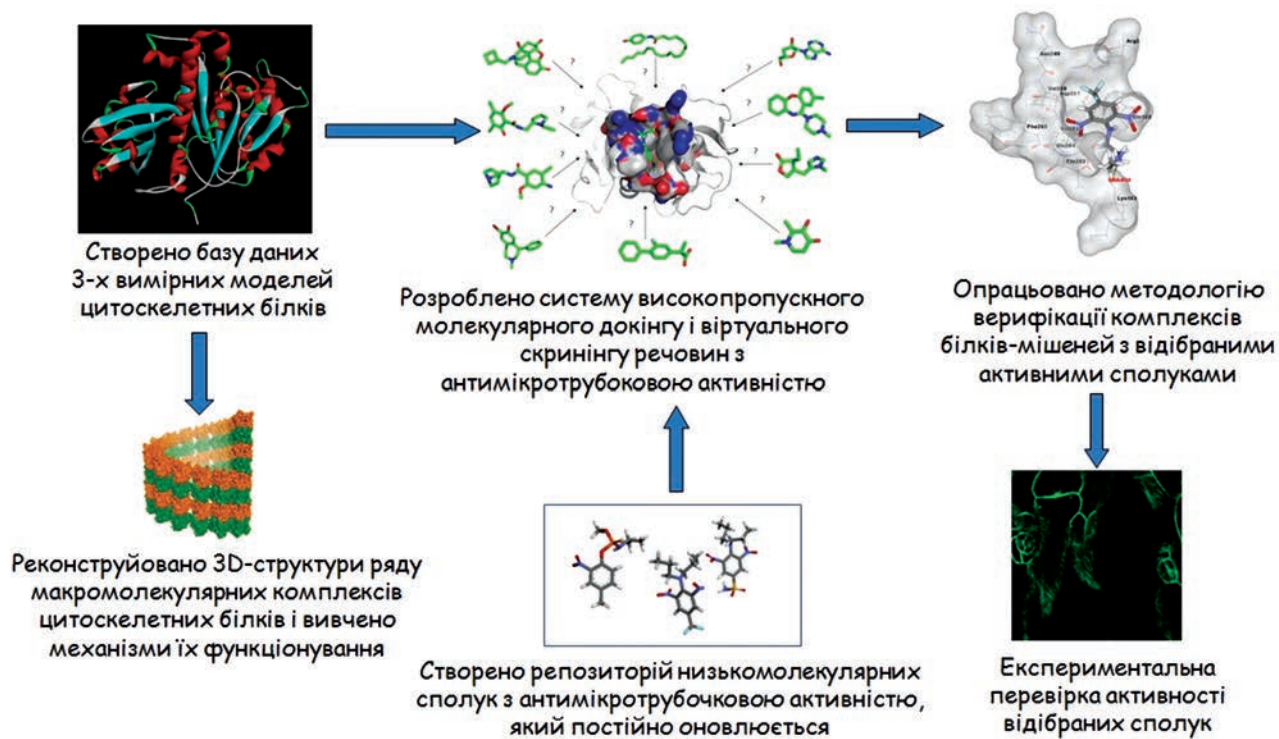


Рис. 1. Застосування Грід-ресурсу VO CSLabGrid для біоінформаційного вивчення цитоскелету та високопропусного віртуального скринінгу речовин з антимікротрубочковою активністю

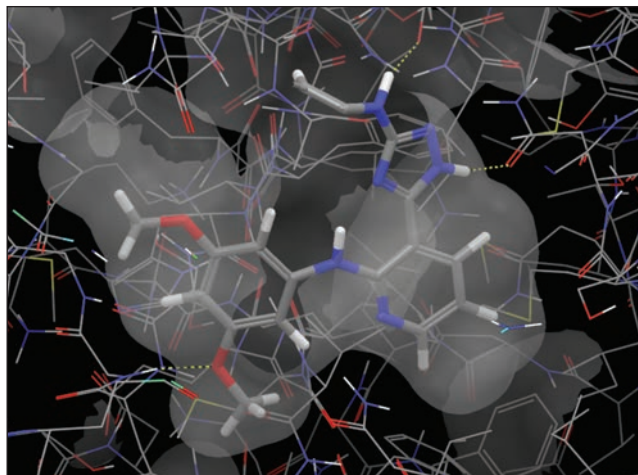


Рис. 2. Результати контрольного докінгу N-(3,5-диметоксифеніл)-3-[3-(3-метоксианіліно)-1H-1,2,4-тріазол-5-іл]піридин-2-аміну у ГТФ-обмінний сайт α -тубуліну з *B. taurus* (структура PDB: 1I4T)

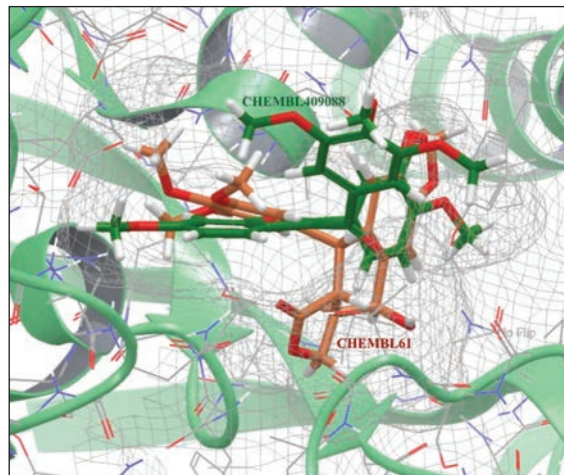


Рис. 3. ГТФ-обмінний сайт α -тубуліну з *B. taurus* (структура PDB: 1I4T) у комплексі з подофілотоксином (CHEMBL61, червоний) та CHEMBL409088 – 2-(3-гідрокси-4-метоксифеніл)-6-метокси-1-бензофуран-3-іл]-(3,4,5-триметоксифеніл)метаноном (зелений)

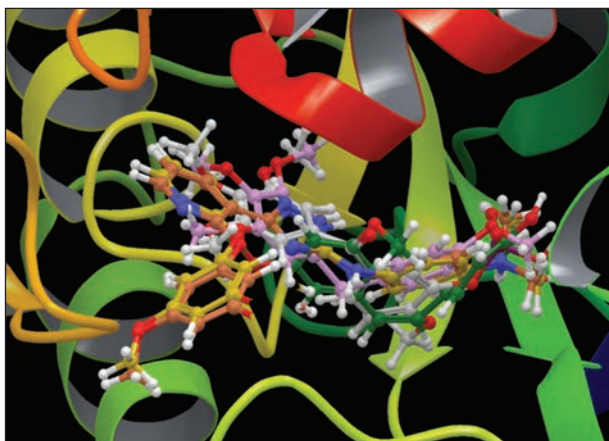


Рис. 4. Приклад структурного порівняння конформації сполук лідерів і контрольної речовини (N-(3,5-диметоксифеніл)-3-[3-(3-метоксианіліно)-1H-1,2,4-тріазол-5-іл]піридин-2-аміну) згідно з результатами докінгу в CCDC Gold (на прикладі комплексів з α -тубуліном)