

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՎՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՍԱՀԱԿՅԱՆ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆ ԿԱՐԱՊԵՏԻ

ՏՈՒԲՈՒԼԻՆԻ ՀԵՏ ԿՈԼԽԻՑԻՆԻ ԵՎ ԴՐԱ ԱՆԱԼՈԳՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՄՈԼԵԿՎՈՒԼԱՅԻՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Գ.00.03 - «Մոլեկուլային և քջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ԵՐԵՎԱՆ – 2021

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ՏԱԿՅԱՆ ԱՐՄԵՆԻՍ ԿԱՐԱՊԵՏՈՎԻՇ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОЛХИЦИНА И ЕГО
АНАЛОГОВ С ТУБУЛИНОМ

ԱՎՏՈՐԵՓԵՐԱՏ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.00.03 – “Молекулярная и клеточная биология”

ԵՐԵՎԱՆ – 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գիտական խորհրդում:

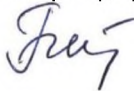
Գիտական ղեկավար՝ Կ.գ.դ. Կարեն Բաբկենի Նազարյան
Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Ֆ.-մ.գ.դ. Արմեն Համլետի Պողոսյան
Կ.գ.թ. Ռոքսանա Վլադիսլավի Զախարյան
Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2021թ. հուլիսի 30-ին, ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, 0014, ք.Երևան, Հասարայան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և <http://www.molbiol.sci.am> կայքում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքվել է 2021թ. հունիսի 18-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու



Գ.Մ. Մկրտչյան

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА.

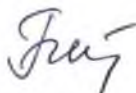
Научный руководитель՝ Ժ.Բ.Ն Նազարյան Կարեն Բաբկենովիչ
Официальные оппоненты: Ժ.Ֆ.-Մ.Ն. Սոգոսյան Արմեն Գամլետովիչ
Կ.Բ.Ն. Զախարյան Ռոքսանա Վլադիսլավովնա
Ведущая организация: Երևանский государственный университет

Защита диссертации состоится 30 июля 2021г. в 14⁰⁰ часов в Институте молекулярной биологии НАН РА, на заседании специализированного совета 042 (РА, 0014, г. Ереван, ул. Э. Асратяна 7)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте <http://www.molbiol.sci.am>.

Автореферат диссертации разослан 18 июня 2021г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук



Մկրտչյան Գ.Մ.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Микротрубочки, состоящие из гетеродимеров тубулина играют важную роль в различных внутриклеточных процессах у эукариот, включая энергозависимый транспорт, сегрегацию хромосом и поддержание морфологии клеток (Etienne-Manneville, 2013). Тубулин состоящий из α и β -субъединиц, полимеризуется, образуя протофиламенты, которые, в последствии, собираются в микротрубочки. В клетках процесс полимеризации происходит непрерывно, микротрубочки постоянно полимеризуются и разрушаются в зависимости от динамики внутриклеточных процессов. Динамика микротрубочек зависит от гуанозинтрифосфата (ГТФ) и двухвалентных ионов магния, с каждой из субъединиц тубулина связывается по одной молекуле ГТФ в комплексе с ионом магния (Dimitrov et al., 2008). Процесс полимеризации микротрубочек зависит от температуры и концентрации ГТФ, однако имеются также некоторые белки и низкомолекулярные соединения, ингибирующие или же, наоборот, активирующие полимеризацию микротрубочек (Jordan & Wilson, 2004). Гетеродимер тубулина имеет несколько сайтов связывания, с которыми взаимодействуют различные лиганды природного происхождения. Подобные низкомолекулярные соединения могут иметь терапевтический эффект в случае некоторых видов рака и часто используются в медицине (Haider et al., 2019).

В 1968 году впервые было доказано, что колхицин ингибирует полимеризацию тубулина и разрушает микротрубочки, тем самым останавливая клеточное деление (Weisenberg et al., 1968). Другие соединения взаимодействующие с сайтом связывания колхицина (ССК), например, комбретастатин, также используются для лечения различных типов новообразований (Sherbet, 2020). Ингибиторы сайта связывания колхицина (ИССК) являются многообещающим средством в борьбе с раком, поскольку они останавливают клеточный цикл активно делящихся опухолевых клеток и вызывают апоптоз (Lu et al., 2012). Более того, ИССК останавливают неопангиогенез и рост новых капилляров, который жизненно необходим для активного роста опухолей (Sherbet, 2017). Разработка новых ингибиторов полимеризации тубулина является важной задачей для лечения новообразований. Однако несмотря на то, что уже имеется множество кристаллографических структур тубулина в комплексе с различными ингибиторами, молекулярные механизмы действия ИССК изучены недостаточно (Akhmanova & Steinmetz, 2015). В частности, в литературе не имеется никаких данных относительно влияния колхицина или его аналогов на энергию взаимодействия между α и β субъединицами тубулина. Между тем, исследование механизмов воздействия колхицина и его аналогов на полимеризацию тубулина важно для эффективного дизайна новых ингибиторов, останавливающих полимеризацию микротрубочек.

Определение свободной энергии связывания между субъединицами тубулина является непростой задачей. Сложность заключается в том, что с каждым мономером тубулина могут быть связаны множество различных лигандов, включая ГТФ/ДФ, которые находятся в комплексе с ионами магния, а также колхицин или же его аналоги, находящиеся на периферии взаимодействия двух субъединиц. Широко применяемый метод докинга не позволяет точно определить энергию связывания в подобных сложных системах, в особенности, когда речь идет о белок-белковых взаимодействиях (Cavasotto & Abagyan, 2004). Для подобных задач более подходящим инструментом является молекулярная динамика и различные методы определения свободной энергии связывания (Brouhard & Rice, 2018). Силловые поля, используемые в молекулярной динамике, позволяют более точно описать химические системы и потенциалы межатомных взаимодействий (Karplus, 2003). Существенным недостатком таких методов является потребность в больших вычислительных ресурсах. Методологическое решение

этой проблемы позволит осуществить фундаментальные исследования для большого количества лигандов и проводить высокопроизводительные скрининги в сложных многокомпонентных системах для поиска новых активных соединений.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – выявление молекулярных механизмов взаимодействия колхицина и его аналогов с гетеродимером тубулина для оптимизации методов поиска новых цитостатиков.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать особенности влияния колхицина и его аналогов на энергию взаимодействия между субъединицами тубулина.
2. Анализировать последствия ряда аминокислотных замен в структуре тубулина на энергию связывания колхицина.
3. Разработать алгоритм для повышения точности докинга и виртуального скрининга в сложных многокомпонентных системах.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. В данной работе исследовалось как колхицин и некоторые его аналоги влияют на свободную энергию связывания α и β субъединицы тубулина. Впервые показано что колхицин, комбретагастин, нокодазол и подофилотоксин в случае гетеродимера тубулина действуют как ингибиторы белок-белкового взаимодействия и уменьшают энергию взаимодействия между субъединицами тубулина. Учитывая тот факт, что все вышеназванные химические соединения действуют схожим образом, имея совершенно разное химическое строение, этот молекулярный механизм можно экстраполировать и на другие цитостатики, которые взаимодействуют с ССК.

Механизм воздействия колхицина и других вышеназванных соединений на архитектуру и динамику микротрубочек можно описать на уровне протофиламентов. В процессе полимеризации гетеродимеры тубулина в первую очередь образуют протофиламенты, которые стабилизируются исключительно за счет продольных контактов (Pampaloni & Florin, 2008). По сути, протофиламенты представляют из себя цепь чередующихся α и β субъединиц тубулина. При воздействии ИССК, взаимодействие между компонентами протофиламента ослабляется что приводит к ее дестабилизации. Учитывая это, мы можем утверждать, что при воздействии колхицина или его аналогов ингибирование полимеризации тубулина начинается уже на стадии протофиламентов, когда гетеродимеры тубулина пока еще не находятся непосредственно в микротрубочках.

Мы также обнаружили что некоторые однонуклеотидные полиморфизмы в гене тубулина вызывают аминокислотные замены в ССК. Молекулярное моделирование этих аминокислотных замен показало, что они влияют на эффективность взаимодействия колхицина с тубулином. Молекулярная динамика и вычисления свободной энергии связывания показали, что при аминокислотных заменах A248T и M257V, энергия взаимодействия колхицина с тубулином уменьшается примерно в два раза. Учитывая эти изменения, можно предположить, что резистентность колхицина может быть обусловлена однонуклеотидными полиморфизмами в гене тубулина, которые приводят к аминокислотными заменам (Sahakyan et al., 2019).

Учитывая особенности молекулярных механизмов взаимодействия колхицина и его аналогов с гетеродимером тубулина, в рамках данной диссертационной работы была также разработана программа для улучшения результатов докинга и виртуального скрининга. Разработанный алгоритм позволяет более точно определить энергию связывания по сравнению с традиционными программами для докинга, улучшая селективность и специфичность виртуального скрининга. Более того, с помощью разработанного алгоритма можно получить количественную и качественную оценку

энергии связывания. Подобные вычисления можно проводить не только между белком и лигандом, но и в более сложных многокомпонентных комплексах, что весьма сложно сделать с помощью традиционных программ для докинга и виртуального скрининга (Sahakyan, 2021).

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были доложены на XII и XIII Годичной научной конференции Российско-Армянского Университета (2016г., 2018г.), на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2017» (2017г.). А так же на семинарах и заседаниях института молекулярной биологии НАН РА и кафедры Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии РАУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ: четыре статьи в зарубежных журналах, реферируемых системой Scopus, и одна публикация в материалах международной конференции.

Объем и структура работы. Работа изложена на 104 страницах, содержит 26 рисунков и 6 таблиц. Библиография включает 199 наименований литературных источников. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Молекулярная динамика. Для симуляций молекулярной динамики использовались программные пакеты GROMACS 2019.3 и AMBER18 поскольку они предоставляют наиболее богатый и гибкий выбор инструментов для обработки и анализа свободной энергии связывания. Для симуляций использовались силовые поля amber99SB-ildn для программы GROMACS 2019.3, ff14SB для AMBER18 и силовое поле GAFF для описания параметров низкомолекулярных соединений в случае обеих программ (Lindorff-Larsen et al., 2010; Maier et al., 2015; Sprenger et al., 2015). Подготовка параметров лигандов проводилась программой antechamber с использованием схемы am1-bcc для определения точечных зарядов атомов (Jakalian et al., 2002).

Для симуляций использовались кристаллографические структуры 4i4t, 5xiw, 5lyj, 5ca1, 5jcb. Все симуляции проводились с шагом в 2 фс в водной среде с использованием TIP3P модели молекул вод (Ozu et al., 2013). Для минимизации на первой стадии был использован steepest descents алгоритм, после чего проводилась дополнительная минимизация, но уже с использованием алгоритма conjugate gradient для более точной минимизации. Температура и давление поддерживались постоянными при 310 К и 1 бар соответственно. Поддержание температуры и давления программе GROMACS осуществлялось алгоритмами Nose-Hoover и Parrinello-Rahman, а в программе AMBER алгоритмами Langevin и Monte-Carlo (Evans & Holian, 1985; Gront et al., 2001; Quigley & Probert, 2004, 2004). Во всех случаях, коррекция температуры и давления осуществлялась каждые 5 пс. Электростатические и Ван-Дер-Ваальсовы потенциалы рассчитывались с помощью схемы PME в диапазоне 1.0 nm. Для визуализации и анализа траекторий МД использовалась программа VMD (Humphrey et al., 1996).

Определение свободной энергии связывания. В наших исследованиях свободная энергия связывания рассчитывалась методами ММ/PBSA и ММ/GBSA, которые имеют достаточно высокую точность для решения сложных задач и в тоже время, они не столь требовательны с точки зрения вычислительных ресурсов. Суть методов ММ/PBSA и ММ/GBSA заключается в определении свободной энергии комплекса белок-лиганд,

белка и лиганда в отдельности, а потом определении разности энергий (Massova & Kollman, 2000). Математически это можно представить в следующем виде:

$$\Delta G_{bind} = G_{complex} - (G_{protein} + G_{ligand}) \quad (1)$$

В формуле (1) $G_{complex}$ это общая свободная энергия комплекса, а $G_{protein}$ и G_{ligand} - свободная энергия белка и лиганда соответственно. В каждом из этих случаев ($G_{complex}$, $G_{protein}$ и G_{ligand}), свободная энергия вычисляется исходя их двух компонентов: молекулярной механики (E_{MM}) и сольватации ($E_{solvation}$).

$$G = E_{MM} + E_{solv} \quad (2)$$

В уравнении (2) каждый из компонентов может быть разделен на несколько составляющих частей. Энергия молекулярной механики (E_{MM}) состоит из связанных и не связанных взаимодействий (bonded and nonbonded interactions). Связанные взаимодействия — это все взаимодействия, которые происходят при наличии ковалентных связей, к этому типу энергий можно отнести энергию ковалентных связей между атомами, а также энергию простых и торсионных углов. Не связанные же взаимодействия, включают в себя Ван дер Ваальсовы и Кулоновские.

Второй компонент в формуле (2), $E_{solvation}$ тоже состоит из двух частей, это энергии воздействия полярного и неполярного растворителя. Неполярная энергия сольватации соответствует площади поверхности доступной растворителю (solvent accessible solvent area, SASA). Полярная энергия сольватации обеспечивается электростатическими взаимодействиями и в методе MM/PBSA рассчитывается уравнением Пуассона – Больцмана (Poisson-Boltzmann, PB), которое позволяет оценить взаимодействие между заряженной поверхностью и электролитом, например заряженной поверхностью белка и физиологическим раствором. Позже этот метод был модифицирован для ускорения вычислений свободной энергии. В методе MM/GBSA, для определения свободной энергии взаимодействия полярного растворителя и заряженной поверхности была использована обобщенная модель Борна (Generalized Born, GB), которая является аппроксимацией уравнения Пуассона – Больцмана, в ней меньше параметров, и по сему она менее требовательна к вычислительным ресурсам, однако она также уступает и по точности (Roux & Simonson, 1999).

Моделирование структуры белков. Структура тубулина была смоделирована с помощью алгоритма I-TASSER, который работает на много быстрее большинства методов моделирования по гомологии и в тоже время не уступает по точности (Roy et al., 2010). Для построения модели, последовательность и структура которой предсказывается, она разделяется на короткие фрагменты и проводится поиск схожих структур в базе данных PDB. На втором этапе фрагменты собираются в полную модель с помощью Монте-Карло симуляции с обменом-реплик (REX MC, replica-exchange Monte Carlo). Участки с маловероятной структурой или же участки, которые имеют наложения атомов, неправильные углы или дистанции между атомами достраиваются заново *ab initio*. В дальнейшем, все структуры кластеризуются, учитывая состояние свободной энергии этих моделей и различия в структуре на основе среднеквадратичного отклонения атомов основной цепи. На третьем этапе, из кластеризованных структур берутся центроиды и процесс повторяется заново. На этом этапе исправляются стерические конфликты (Y. Zhang & Skolnick, 2005). Для построения окончательной модели, выбирается структура с наименьшей энергией, и на основе оптимизации системы водородных связей, конечная модель достраивается и минимизируется.

С помощью вышеописанного алгоритма была смоделирована третичная структура тубулина $\beta 1$, которая не имела кристаллографической доказанной структуры.

Полученная модель была использована для изучения влияния аминокислотных замен, характерных для тубулина $\beta 1$, при взаимодействии колхицина с тубулином. Кроме нативной структуры тубулина $\beta 1$ были также смоделированы 7 мутаций, которые находились в сайте связывания. Для моделирования аминокислотных замен в структуре тубулина была использована программа ICM-pro 3.8 (Abagyan et al., 1994).

Докинг и виртуальный скрининг. Для валидации разработанной программы, мы сравнивали ее точность с программой SMINA, которая широко применяется для докинга и виртуального скрининга (Koes et al., 2013). SMINA является модифицированной и улучшенной версией популярной программы AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009). Во время виртуального скрининга, сайт связывания определялся за счет нативного лиганда, который присутствовал в кристаллографической структуре. Для докинга каждого соединения использовались аминокислоты белка в радиусе 6 Å от нативного лиганда. Для поискового алгоритма использовалась глубина поиска в 8 шагов (exhaustivity=8).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ингибиторов полимеризации тубулина с сайтом связывания колхицина

В базе данных кристаллографических структур, кроме колхицина имеется более десятка различных ингибиторов полимеризации тубулина, которые связываются в ССК. С помощью методов молекулярного моделирования мы исследовали особенности взаимодействия колхицина, комбретастина, нокодазола и подофилотоксина (Рис. 1) с гетеродимером тубулина. Все эти соединения, за исключением нокодазола, который является синтетическим антимитотическим агентом, имеют растительное происхождение, и взаимодействует с ССК (De Clerck & De Brabander, 1977; Terkeltaub, 2009; Y. Wang et al., 2016). Эти соединения сертифицированы разными международными организациями и используются в медицине (Wishart et al., 2018)

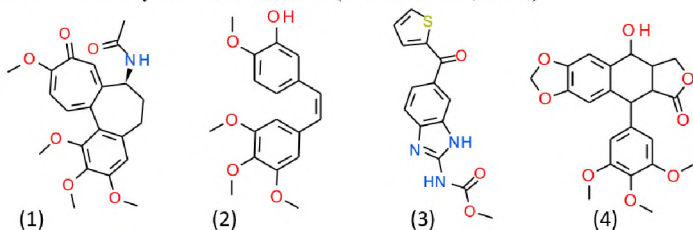


Рисунок 1. Химическое строение колхицина (1), комбретастина (2), нокодазола (3) и подофилотоксина (4).

Для всех вышеперечисленных соединений имеются кристаллографические структуры в комплексе с тубулином, которые были использованы для симуляций МД в нашей работе. Чтобы выявить отличия в механизмах связывания этих лигандов, мы исследовали контакты, образуемые исследуемыми лигандами с β -субъединицей тубулина. Несмотря на то, что связывание лигандов происходило в одном и том же сайте, аминокислоты участвующие в связывании лигандов отличаются достаточно сильно (Рис. 2). Особенно явно эти отличия видны в случае нокодазола, где существует целый ряд аминокислот, которые участвуют только при связывании нокодазола (Y50, Q134, N165, F167, Y200, M233, T237). Трудно судить является ли подобное отличие результатом того, что

нокодазол синтетическое соединение или же другие природные соединения тоже могут иметь механизм связывания отличный от исследованных природных ингибиторов полимеризации тубулина.

Ligand	Y50	Q134	N165	F167	Y200	M233	V236	T237	C239	L240	Q245	L246	A248	D249	L250	K252	L253	N256	M257	T312	V313	A314	A315	V316	N348	K350	T351	A352	I368	
Colchicine																														
Combretastatin																														
Nocodazole																														
Podophyllotoxin																														

no contact
 backbone contact
 side chain contact
 backbone+side chain

Рисунок 2. Нативные контакты, характерные для связывания каждого соединения.

Однако есть также аминокислоты (C230, L240, L253, N256, A314 и K350), которые участвуют в связывании всех четырех лигандов, связывание в некоторых случаях происходит за счет боковой цепи, а в некоторых за счет основной цепи. Только цистеин в 230 положении и лейцин в 240 взаимодействуют со всеми четырьмя лигандами за счет боковых цепей.

Влияние колхицина и его аналогов на энергию взаимодействия между α и β субъединицами тубулина.

Совершенно не исследован вопрос о том, как наличие низкомолекулярных соединений в ССК сказывается на энергии взаимодействия между α и β субъединицами. На первый взгляд, исходя из того, что колхицин и его аналоги ингибируют полимеризацию тубулина, логично было бы предположить, что они должны приводить к уменьшению энергии взаимодействия между субъединицами. Однако, были выдвинуты предположения, объясняющие ингибирующий эффект колхицина иным образом (Dubey et al., 2017; Lu et al., 2012). Например, сравнение кристаллографических структуры показало, что связывание лиганда в ССК приводит к искривлению оси между α и β субъединицами. Подобные конформационные изменения могут приводить к тому, что тубулин будет полимеризовываться, образуя стереохимически не правильные протофиламенты, которые не способны собираться микротрубочки (A. E. Prota et al., 2014; Ravelli et al., 2004; Steinmetz & Prota, 2018). Тем не менее, вышеупомянутые конформационные изменения могут сопровождаться как увеличением свободной энергии взаимодействия между субъединицами, так и его уменьшением.

Используя траектории симуляций МД димера тубулина в комплексе с различными лигандами в ССК, мы провели ряд вычислений свободной энергии связывания, чтобы понять как наличие колхицина и его аналогов отображается на энергию взаимодействия α и β субъединицы. В качестве контроля использовался свободный димер тубулина (pdbid 4i4t). При вычислениях, в качестве рецептора рассматривалась β -субъединица, ингибитор в ССК и молекула ГДФ в комплексе с магнием, а в качестве лиганда рассматривалась α -субъединица с молекулой ГТФ и магнием. Ингибиторы в ССК частично взаимодействуют с α -субъединицей, но в основном они находится в β -субъединице, поэтому при вычислениях было логичнее рассматривать их как часть β -субъединицы (Рис. 3).

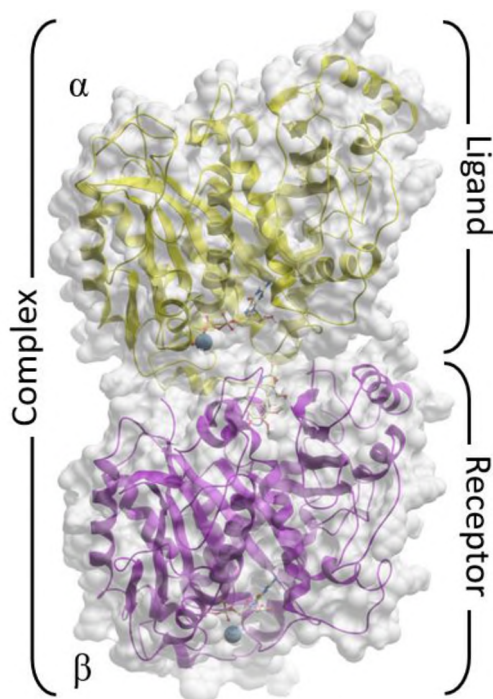


Рисунок 3. Схема определения свободной энергии связывания между субъединицами тубулина.

При отсутствии лиганда в ССК, согласно нашим вычислениям, взаимодействие между субъединицами тубулина происходит с энергией -93.2 ккал/моль. Аналогичные анализы, но уже при наличии колхицина, показали, что энергия связывания составляет -65.3 ккал/моль. Это подтверждает предположение о том, что связывание колхицина с димером тубулина уменьшает энергию взаимодействия между его субъединицами.

В структуре тубулина важную роль выполняет молекула ГТФ, связанная с ионом двухвалентного магния, которая тоже локализуется между субъединицами тубулина напротив ССК. С β -субъединицей комплекс ГТФ/Mg взаимодействует с положительной энергией 14.3 ккал/моль, однако это отталкивающее

действие компенсируется за счет других аминокислотных остатков. Как результат α и β субъединицы тубулина в целом взаимодействуют с отрицательной силой, а комплекс остается в стабильном состоянии и не распадается.

Определение энергии связывания для каждой аминокислоты в отдельности, но уже при наличии колхицина показало некоторые важные изменения, который приводят к уменьшению энергии взаимодействия между субъединицами тубулина. Петля T7 в отсутствие лиганда находится в закрытой конформации, в таком состоянии ССК отличается по многим физико-химическим параметрам от открытой конформации ССК (Nguyen et al., 2005; Н. К. Sahakyan et al., 2018).

При связывании колхицина или какого-либо другого лиганда с этим сайтом, петля смещается в сторону комплекса ГТФ/Mg. Наиболее масштабные конформационные изменения происходят с аминокислотами GLN-247 и ASN-249. Когда тубулин находится в свободном состоянии эти аминокислоты направлены во внутрь сайта связывания, а наличие колхицина и его аналогов в ССК приводит к тому, что эти аминокислоты перемещаются на поверхность. После подобных конформационных изменений в вышеназванных полярных аминокислотах, меняется электростатический профиль поверхности β -субъединицы, и, как результат, она становится более электроотрицательной (Рис. 4). Учитывая электроотрицательную поверхность комплекса ГТФ/Mg, которая находится на против β -субъединицы, логично предположить, что эти две электрозаряженные поверхности, несущие отрицательный заряд и расположенные в непосредственной близости друг к другу, будут отталкиваться. Как было отмечено ранее, при отсутствии колхицина в сайте связывания, ГТФ/Mg взаимодействуют с β -субъединицей с энергией 14.3 ккал/моль, однако после связывания колхицина и

вышеописанных изменений энергия связывания увеличивается до 19.8 ккал/моль, в результате чего комплекс ГТФ/Mg и β -субъединица начинают отталкиваться друг от друга с еще большей силой.

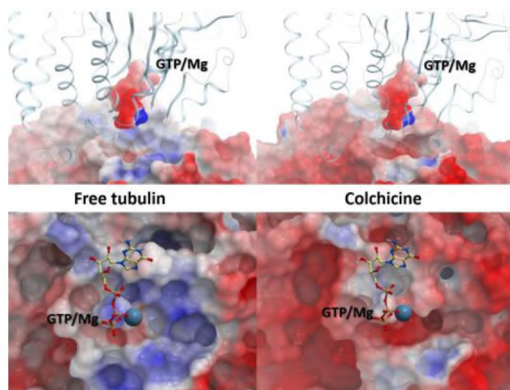


Рисунок 4. Электростатическая поверхность β -субъединицы при отсутствии и наличии колхицина. На верхней части рисунка показан вид с боку, на нижней, вид с веру. Красный цвет показывает отрицательный заряд поверхности, белый - нейтральный, синий -положительный. Структура α -субъединицы визуализирована в виде ленты.

Чтобы понять, является ли уменьшение энергии связывания между субъединицами при связывании лиганда в ССК общим механизмом, или это только частный случай для колхицина, мы провели те же самые анализы с аналогами колхицина. Наличие комбрегастатина в ССК также привело к уменьшению энергии связывания между субъединицами до -55.5 ккал/моль, что почти в двое меньше энергии взаимодействия при отсутствии лиганда, примерно тоже самое наблюдалось и в случае колхицина. Важно отметить, что, в этом случае наблюдаются такие же изменения, как и в случае с колхицином, меняется электростатическая поверхность белка в результате чего ГТФ в комплексе с магнием отталкивает β -субъединицу с энергией 18.7 ккал/моль. Такие же изменения происходят и при связывании подофилотоксина, энергия связывания между субъединицами уменьшается до -47,8 ккал/моль. Отталкивающая энергия между ГТФ/Mg и β -субъединицей увеличивается до 22.1 ккал/моль, как и при связывании колхицина и комбрегастатина.

Во всех вышеописанных случаях, механизм действия схож, аминокислоты GLN-247 и ASN-249 на петле T7 смещаются, меняя электростатический профиль поверхности что приводит к еще более сильному отталкиванию комплекса ГТФ/Mg, в результате чего общая энергия взаимодействия между субъединицами уменьшается. Обобщенная информация об изменениях в свободной энергии связывания между субъединицами тубулина, а также между ГТФ/магнием и β -субъединицей, приведена в таблице 1.

Таблица 1. Обобщенная информация об изменениях в свободной энергии связывания.

Комплекс	pdbid	$\Delta G \alpha/\beta$	$\Delta G \text{GTP}/\beta$
Свободный тубулин	4i4t	-93.2 \pm 2.7	14.3 \pm 2.53
Тубулин-колхицин	5xiw	-65.3 \pm 1.6	19.8 \pm 2.14
Тубулин-комбрегастатин	5lyj	-55.5 \pm 1.2	18.7 \pm 2.13
Тубулин-нокодазол	5cal	-86.5 \pm 2.1	28.5 \pm 1.48
Тубулин-подофилотоксин	5jcb	-47.8 \pm 2.1	22.1 \pm 2.04

Более слабая выраженность того же эффекта наблюдается в случае нокодазола при связывании которого, изменения энергии незначительны, -86.5 при наличии нокодазола и -93.2 в его отсутствие. Отличительное поведение нокодазола объясняется характером его связывания, который отличен от колхицина, комбретастина, подофилотоксина, а также и большинства подобных соединений. Нокодазол связывается глубже в центральном домене, в это случае петля T7 смещается не так сильно, как в случае других ИССК (Wang et al., 2016).

Некоторые авторы даже отмечают сайт связывания нокодазола как отдельный сайт, отличный от ССК (Guzmán-Ocampo et al., 2018). Нокодазол в отличие от всех остальных ИССК, которые были исследованы в этой работе, взаимодействует с целым рядом аминокислот характерных исключительно для этого лиганда (Y50, Q134, N165, F167, Y200, M233, T237). Учитывая это, весьма вероятно, что механизм действия нокодазола не связан с отталкивающим действием комплекса ГТФ/Мг, и существуют иные механизмы, ингибирующие полимеризацию тубулина, которые нам пока не известны.

Рассуждая о возможных последствиях понижения энергии связывания между α и β субъединицами тубулина, в первую очередь нужно отметить то, что процесс полимеризации и роста микротрубочек сильно зависит от термических флуктуаций. Всякие изменения в температуре среды непосредственно влияют на процесс полимеризации, ускоряя или замедляя ее. Известно, что димеры тубулина в микротрубочках стабилизируются за счет продольных и латеральных контактов (Pampaloni & Florin, 2008). Чем эти связи прочнее, тем стабильнее микротрубочки, этим объясняется стабилизирующий эффект паклитаксела и других соединений, укрепляющих латеральные контакты в микротрубочках и активирующих полимеризацию тубулина (Akhmanova & Steinmetz, 2015; Sirakanyan et al., 2021).

Процесс роста микротрубочек сначала происходит исключительно за счет продольных контактов, когда каждая α -субъединица тубулина связывается с β -субъединицей предыдущего димера, образуя так называемые протофиламенты (Akhmanova & Steinmetz, 2015; Goodson & Jonasson, 2018). Только после этого, когда протофиламенты имеют достаточную длину они связываются друг с другом за счет латеральных контактов образуя листы, которые в последствии сворачиваются в микротрубочки (Pampaloni & Florin, 2008). По сути, протофиламенты представляют из себя цепь α и β субъединиц, соединённых между собой продольными контактами (Рис. 5).

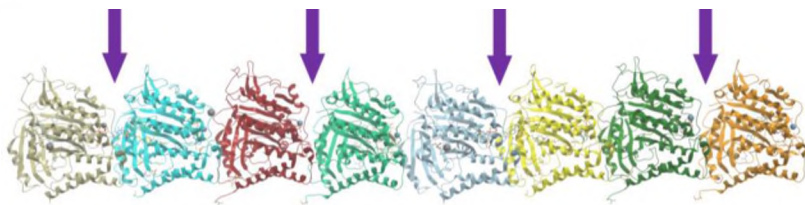


Рисунок 5. Структура протофиламента. Места связывания колхицина и его аналогов показаны стрелками. В этих же местах происходит уменьшение взаимодействия между составными частями протофиламента.

Исходя из того, что протофиламенты стабилизируются исключительно за счет продольных контактов, уменьшение энергии связывания между составными частями цепи будет непременно приводить к дестабилизации протофиламентов. Это свидетельствует в пользу того, что колхицин и его аналоги, дестабилизируют

микротрубочки на ранней стадии их полимеризации, когда только начинается сборка протофиламентов.

Наша работа фактически доказывает, что некоторые низкомолекулярные соединения, связывающиеся с ССК по сути своей, являются ингибиторами белок-белкового взаимодействия. Исследование механизмов ингибирования полимеризации тубулина с помощью колхицина и аналогичных соединений, необходимо для понимания динамики микротрубочек. Это важно как для понимания молекулярных механизмов действия цитостатиков, взаимодействующих с микротрубочками, так и для рационального дизайна новых и более эффективных лекарств.

Полиморфизм тубулина как возможный механизм резистентности к колхицину

Колхицин является основным лекарством для подавления симптомов семейной Средиземноморской лихорадки. По разным данным от 2 до 5% больных ССЛ имеют резистентность к колхицину (Ben-Chetrit & Amar, 2009; Özen et al., 2020). Существуют различные гипотезы, объясняющие механизм резистентности к колхицину, но до сих пор не одна из них не была окончательно подтверждена, и до сих пор нет консенсуса по этому вопросу (Ozen et al., 2017). Исследуя механизмы взаимодействия колхицина с тубулином, мы выяснили что существуют различные одионуклеотидные полиморфизмы в гене тубулина и некоторые из них приводят к аминокислотным заменам в ССК (Grant & Mascord, 1996). Мы предположили, что подобные изменения в гене тубулина, которые приводят к структурным изменениям могут иметь физиологические последствия поскольку они способны влиять на энергию связывания колхицина с тубулином (Sahakyan et al., 2019).

В гене тубулина $\beta 1$ мы обнаружили 7 одонуклеотидных полиморфизмов в базе данных dbSNP, которые располагаются непосредственно в ССК и приводят к аминокислотным заменам (Ser239Tyr, Ala248Thr, Leu253Val, Met257Val, Met257Thr, Ala314Val, Ile316Val). Мы смоделировали структуру тубулина $\beta 1$ и эти аминокислотные замены для провели МД и определения свободной энергии связывания. Энергия взаимодействия определялась также и для нативного тубулина $\beta 1$, в котором не было никаких аминокислотных замен.

В процессе молекулярной динамики не происходило значимых конформационных изменений в структуре тубулина и в конформации связывания колхицина. Флуктуации в среднеквадратичном отклонении и в радиусе гирации, который показывает компактность укладки белка, происходили в диапазоне 0.2 нм, что нормально для глобулярных белков с упорядоченной структурой. Более значимые изменения происходили в свободной энергии связывания. В случае нативного тубулина $\beta 1$ взаимодействие с колхицином происходит с энергией -156.8 кДж/моль. Основной вклад в связывании колхицина в этом случае имеют аминокислотные остатка Ser-239, Leu-246, Ala-248, Leu-250, Lys-252, Leu-253, Asn-256, Met-257, Thr-312, Ala-314, Ile-316. Среди этих аминокислот наибольший вклад в свободную энергию связывания имеет лейцин в 253 положении (Leu-253), который связывается с колхицином с энергией -14,42 кДж/моль (Рис. 6). Замена этой аминокислоты на валин приводит к снижению энергии взаимодействия до -6.54 кДж/моль. Однако, в общем энергия взаимодействия изменяется не столь значительно, с -156.8 до -138.7 кДж/моль.

Более заметные изменения в свободной энергии связывания происходят при заменах A248T и M257V, которые вызваны полиморфизмами rs148237574 и rs759579888 соответственно. В этих случаях изменения затрагивают энергию связывания почти всех аминокислот, и общая энергия связывания уменьшается примерно вдвое. Замена аланина на треонин в 248 положении снижает энергию связывания до -84 кДж/моль. Механизм

подобного изменения в энергии связывания, вероятно связан, с заменой гидрофобной аминокислоты на полярную, что влияет на общее состояние физико-химических параметров сайта связывания, который является гидрофобным.

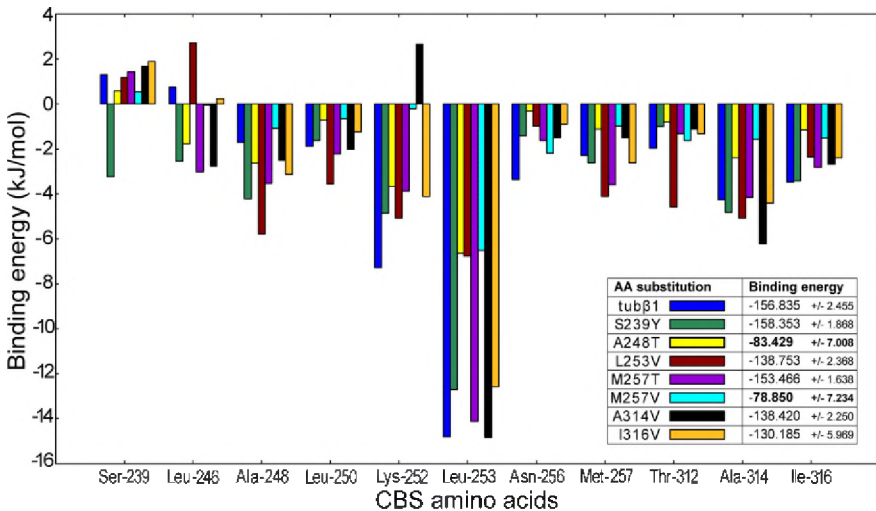


Рисунок 6. Распределение энергии связывания колхицина с различными аминокислотами для нативного тубулина $\beta 1$ и других вариантов с аминокислотными заменами. В нижнем правом углу представлена общая энергия связывания.

Однако в случае замены метионина на валин в 257 положении не происходит существенных изменений в гидрофобных свойствах кармана, поскольку метионин, как и валин является гидрофобной аминокислотой. Тем не менее, стереохимические изменения в случае замены M257V приводят к тому, что колхицин смещается из кармана наружу, что и приводит к изменению энергии связывания.

Полученные результаты согласуются с нашей рабочей гипотезой о том, что аминокислотные замены в ССК могут влиять на эффективность связывания колхицина и снижать его терапевтическую активность или же приводить к невосприимчивости к колхицину. Однако, чтобы резистентность к колхицину объяснялась бы исключительно аминокислотными заменами в сайте связывания, полиморфизмы, приводящие к подобным мутациям, должны иметь высокую частоту встречаемости (2-5%), сопоставимую с частотой встречаемости резистентности к колхицину у пациентов, но частота встречаемости этих полиморфизмов на много меньше (Ben-Chetrit & Aamar, 2009). Возникают так же и другие вопросы, например, могут ли данные полиморфизмы встречаться чаще и быть специфичны для популяций Средиземноморья? На сегодняшний день, к сожалению, нет достаточно данных о встречаемости этих полиморфизмов в популяциях страдающий ССЛ и эти вопросы пока что остаются без ответов.

Весьма вероятно что резистентность к колхицину может быть обусловлена несколькими факторами. Существуют гипотезы, предполагающие что мутации в гене ABCB1/MDR1, могут также приводить к резистентности, тем не менее достоверно подтвердить эту гипотезу пока что и не удалось (Bezalel et al., 2009; Wellhöner et al., 2012). Другие гипотезы связаны с уровнем цитохрома P450, взаимодействием

колхицина с другими лекарствами, вовлеченностью колхицина в некоторые метаболические циклы и т. д. (El Hasbani et al., 2019; Ozen et al., 2017; Özen et al., 2020). В любом случае важно отметить, что гипотеза, выдвинутая нами, не конфликтует с другими гипотезами, а наоборот дополняет их. С нашей точки зрения, вероятнее всего резистентность или же невосприимчивость к колхицину обусловлена несколькими причинами и описанный выше механизм может быть частью резистентности к колхицину.

iPBSA: Автоматизация MM/GBSA и MM/PBSA методов для высокопроизводительного скрининга

Молекулярный докинг является одним из основных инструментов в вычислительной химии, который часто используется для определения энергии и конформации связывания лиганда с белком (Cavasotto & Orry, 2007). Правильное определение энергии связывания является важнейшим компонентом в этом процессе. Оценочные функции, используемые алгоритмами докинга в основном созданы для быстрой оценки аффинности большого количество лигандов (Li et al., 2019). Однако хорошо известно, что данные оценочных функций об аффинности, часто не имеют корреляции с экспериментальными данными (Rastelli et al., 2009).

В нашей работе был разработан алгоритм iPBSA для улучшения результатов докинга и виртуального скрининга. Изначально алгоритм тестировался и оптимизировался для ССК, поскольку этот сайт является сложной мишенью для программ докинга. Более того, алгоритмы большинства программ для докинга, как и их оценочные функции не предназначены для определения энергии связывания в сложных многокомпонентных комплексах. Однако, как мы показали, определение свободной энергии связывания между субъединицами белка при наличии различных лигандов может быть необходимо. Например, такой подход может быть использован для поиска ингибиторов или модуляторов белок-белкового взаимодействия. С этой точки зрения, разработанный нами алгоритм имеет меньше ограничений, и может определять энергию связывания между любыми сложными комплексами имеющими биологическую природу.

Алгоритм iPBSA основан на открытом программном пакете AmberTools18 и написан на языке bash (Macke et al., 2010). iPBSA проводит минимизацию для исследуемых лигандов в комплексе с рецептором после чего определяет энергию связывания методами MM/PBSA и/или MM/GBSA. Алгоритм работает параллельно на большинстве операционных системах семейства Unix/Linux без каких-либо дополнительных программных пакетов или библиотек. Полный код доступен по следующей ссылке: <https://github.com/sahakyanhk/iPBSA>.

Принцип работы алгоритма кратко проиллюстрирован на рисунке 7. На первом этапе алгоритм считывает координаты рецептора и лиганда, определяет точечные заряды атомов методом AM1-BCC и описывает параметры всех взаимодействий в комплексе. После этого комплекс минимизируется и используется для определения энергии связывания методами MM/GBSA и/или MM/PBSA. На последнем этапе происходит обработка полученных результатов и составляется список с названиями лигандов и данными о свободной энергии связывания. Для проверки алгоритма на мы протестировали несколько тестов с различными мишенями, чтобы сравнить точность докинга и разработанного алгоритма. Для каждой мишени была составлена виртуальная база лигандов, среди которых были как экспериментально доказанные активные соединения, которые достоверно взаимодействуют с тестируемым рецептором, так и не активные соединения, которые имитировали физико-химические параметры активных соединений

(близкие масса, липофильность, количество доноров и акцепторов водородных связей и т. д.), но, по сути, имели совершенно другое химическое строение и никак не взаимодействовали с рецептором (Mysinger et al., 2012; Tran-Nguyen & Rognan, 2020). Например, в качестве активных соединений, взаимодействующих с ССК, мы использовали структуры лигандов, которые имеют кристаллографические структуры в комплексе с тубулином. Мы использовали эти структуры для создания базы неактивных лигандов.

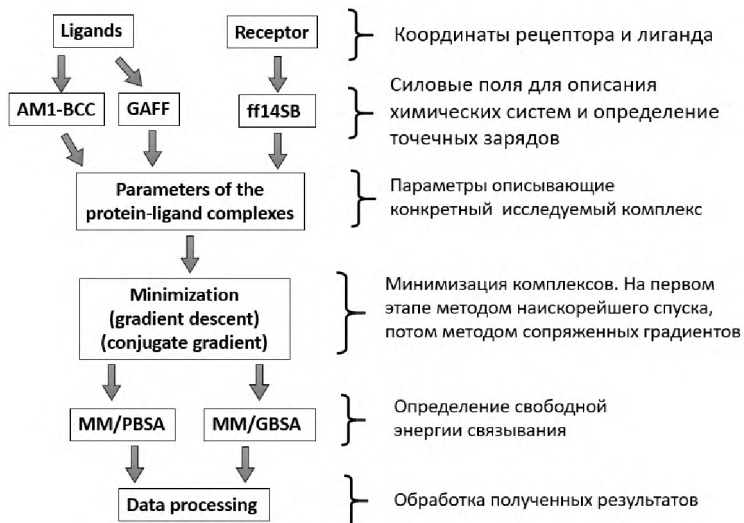


Рисунок 7. Принцип работы алгоритма iPBSA.

Кроме тубулина алгоритм был протестирован также с белками FABP4, PUR2, K1TN. Данные белки с готовыми библиотеками активных и неактивных лигандов были получены из базы данных DUD-E. Гидрофобность, объем, площадь поверхности и степень открытости сайтов связывания в этих белках, по возможности, отличались, чтобы исследовать поведение алгоритма при различных условиях. Используя вышеописанные библиотеки лигандов, мы провели виртуальный скрининг для каждого белка, и затем для каждого лиганда были отобраны конформации с наилучшей аффинностью согласно результатам докинга. После этого выбранные конформации были минимизированы в комплексе с белком и эти структуры использовались для расчета свободной энергии связывания с помощью автоматизированных методов MM/GBSA и MM/PBSA. Для сравнения точности и валидации нашего алгоритма была проведена бинарная классификация и построены ROC-кривые (Zhao et al., 2009).

Сравнение показало, что в случае тубулина AUC увеличивается после минимизации и перерасчета энергии связывания (Рис. 8), что свидетельствует в пользу того, что iPBSA улучшает результаты виртуального скрининга и более точно определяет свободную энергию связывания. Кроме того, можно заметить, что в случае MM/PBSA результаты превосходят по точности MM/GBSA, хотя расчеты с помощью MM/PBSA при прочих равных условиях как минимум в 5 раз медленнее чем расчеты MM/GBSA. Схожие результаты были получены и после анализа трех остальных белков. Во всех случаях после минимизации и определения свободной энергии связывания полученные результаты превосходили по точности результаты виртуального скрининга.

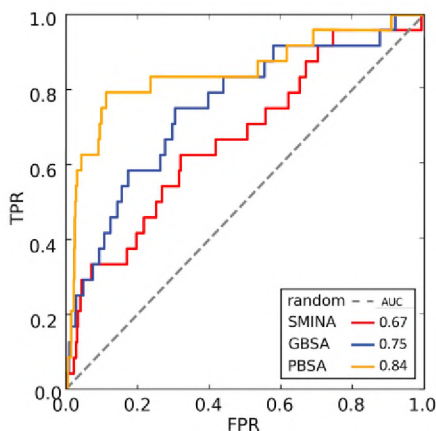


Рисунок 8. Валидация алгоритма iPBSA на структуре тубулина (в ССК). ROC-кривые для докинга, MM/GBSA и MM/PBSA, показаны красным, синим и оранжевым соответственно. Значение AUC для каждой кривой показано в левом нижнем углу.

Из обобщенных результатов, представленных в таблице 2, можно заключить, что с помощью минимизации и MM/PB(GB)SA методов можно улучшить результаты виртуального скрининга и более точно рассчитать энергию связывания.

Таблица 2. Результаты валидации алгоритма iPBSA.

Белок	Метод	AUC	BEDROC _{20%}	EF1%	EF3%	EF5%	EF10%
TUB α	Docking	0.67	0.19	4.02	4.01	5.61	3.21
	GBSA	0.75	0.25	8.02	6.68	4.815	3.61
	PBSA	0.84	0.46	8.02	14.71	11.23	6.42
FABP4	Docking	0.78	0.41	28.62	11.92	7.63	4.77
	GBSA	0.98	0.94	50.08	31.79	20.03	10.02
	PBSA	0.84	0.40	7.15	11.92	9.54	5.48
PUR2	Docking	0.89	0.66	31.63	20.03	12.43	7.77
	GBSA	0.95	0.76	38.41	21.52	16.42	8.88
	PBSA	0.93	0.76	42.93	24.48	15.09	7.55
KITN	Docking	0.87	0.62	39.11	18.25	12.12	6.48
	GBSA	0.89	0.68	19.56	22.16	15.25	8.05
	PBSA	0.88	0.74	43.02	24.12	14.47	7.26

Для более точного сравнения методов мы использовали и другие параметры, поскольку AUC показывает точность для выборки в целом, а в случае виртуального скрининга обычно проверяется активность 1-10% соединений, которые показали наилучшую аффинность. Исходя из этого, логично было рассчитать такой параметр как коэффициент насыщения (enrichment factor, EF), который показывает отношение активных и неактивных соединений в определенной фракции соединений. Мы рассчитали фактор насыщения для 1, 3, 5 и 10% соединений с наилучшей энергией связывания. Кроме этого, мы также рассчитали показатель BEDROC для которого, в отличие от фактора насыщения, учитывается не просто соотношение активных и неактивных соединений, но и непосредственно энергия связывания, соединениям с высокой энергией придается больший вес и поэтому показатель BEDROC можно считать более объективным (Truchon & Bayly, 2007).

В вышеописанном алгоритме критическую роль играет процесс минимизации, без которого перерасчет свободной энергии связывания с помощью MM/PBSA и MM/GBSA показывает AUC около 0.50, что практически означает отсутствие какой-либо предсказательной способности. Связывание лиганда неизбежно влияет на структуру

сайта связывания белка, однако подавляющее большинство программ для докинга, либо вовсе не моделируют гибкость белка, либо моделируют частично. С этой точки зрения ССК для докинга является сложной мишенью поскольку там имеются петли T7 от β -субъединицы и T5 от α -субъединицы, которые весьма подвижны. В отличие от других вторичных структур, которые образуют ССК, конформация этих петель меняется поразному в зависимости от того какой лиганд связывается в сайте.

В процессе минимизации происходят определенные изменения в структуре белка, атомы лиганд-белкового комплекса смещаются в сторону большего энергетического минимума. Этот процесс частично имитирует гибкость белка и позволяет более точно определить свободную энергию связывания. Безусловно смещение на небольшие величины не может полностью имитировать гибкость сайта связывания, но как показывают результаты тестов, где сравнивались точность докинга и разработанного нами алгоритма, даже небольшое смещение атомов в сайте связывания в определенной степени влияют на точность определения свободной энергии связывания (Sahakyan, 2021).

Важно также отметить, что описанный здесь алгоритм предназначен для более точного расчета энергии связывания и определения ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Однако точность работы зависит от того насколько правильно конформация связывания была предсказана ранее с помощью докинга. Тем не менее, важно отметить, что параметры силовых полей ff14SB и GAFF в комплексе AM1-BCC методом определения зарядов описывают лиганд-белковые системы намного точнее, чем большинство оценочных функций, и позволяют определять энергию взаимодействия не только между белком и лигандом, а также и между другими молекулами различной биологической природы (Tsai et al., 2010; J. Wang et al., 2004).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе было рассмотрено как колхицин и некоторые его аналоги влияют на энергию взаимодействия α и β субъединицы тубулина. Вычисления свободной энергии связывания показали, что практически во всех исследованных случаях наличие лиганда в ССК приводило к тому, что энергия взаимодействия ослабевала. Исследование конформационных изменений в ССК, которые происходили в результате связывания лигандов, показало, что в результате смещения полярных аминокислот GLN-247 и ASN-249 происходит изменение в электростатической поверхности β -субъединицы. В результате этих изменений между β -субъединицей и ГТФ возникает отталкивающая сила что и приводит к ослаблению взаимодействия между α и β субъединицами. Данный механизм подтверждает предположение, что колхицин и его аналоги дестабилизируют протофиламенты микротрубочек, которые стабилизируются исключительно за счет промежуточных контактов. Это свидетельствует в пользу выявления новых тонких механизмов диссоциации протофиламентов и динамики микротрубочек.

Мы также исследовали некоторые аминокислотные замены в сайте связывания колхицина, причиной которых являются однонуклеотидные полиморфизмы в гене тубулина. Моделирование аминокислотных замен и их воздействие на энергию связывания колхицина показало, что замены A248T и в M257V положениях приводят к двухкратному уменьшению энергии связывания. Подобные изменения в энергии связывания позволяют предположить, что полиморфизмы в гене тубулина могут быть одной из причин резистентности к колхицину.

Наконец учитывая необходимость в более точном определении энергии связывания в задачах виртуального скрининга мы создали алгоритм, который позволяет улучшить селективность и специфичность виртуального скрининга. Кроме того, как мы убедились,

иногда бывает необходимо определять энергию связывания не просто между белком и лигандом, а между сложными комплексами, которые состоят из нескольких молекул. За счет минимизации конформаций связывания, которые были предсказаны программами для докинга или же получены экспериментальным путем, наш алгоритм имитирует пластичность белка и смещает координаты комплекса к большему энергетическому минимуму, после чего энергия связывания определяется с помощью методов MM/GBSA и MM/PBSA, которые точнее предсказывают энергию связывания, по сравнению с оценочными функциями программ для докинга. К преимуществам нашей программы также относится то, что она способна определять энергию связывания между сложными многокомпонентными макромолекулярными комплексами.

Результаты данного исследования раскрывают фундаментальные детали действия ингибиторов полимеризации тубулина. Молекулярные механизмы, изученные в этой работе, а также алгоритм, который может иметь широкое практическое применение, создают основу для более эффективного дизайна новых ингибиторов полимеризации тубулина.

ВЫВОДЫ

1. При взаимодействии колхицина и некоторых его аналогов с тубулином уменьшается энергия связи между α и β субъединицами белка, в результате чего ингибиторы сайта связывания колхицина способны разрушить микротрубочки на ранней стадии образования протофиламентов.
2. Резистентность к колхицину может быть обусловлена аминокислотными заменами A248T и M257V, которые приводят к уменьшению энергии связывания цитостатика с тубулином.
3. Разработанный нами алгоритм iPBSA повышает точность виртуального скрининга и позволяет дать количественную и качественную оценку свободной энергии связывания в сложных макромолекулярных комплексах.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Sahakvan H. Improving virtual screening results with MM/GBSA and MM/PBSA rescoring. // Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2021; 35(5):1-6. <https://doi.org/10.1007/s10822-021-00389-3>
2. Sirakanyan S., Arabyan E., Hakobyan A., Hakobyan T., Chilingaryan G., Sahakvan H., Sargsyan A., Arakelov G., Nazaryan K., Izmailyan R., Abroyan L., Karalyan Z., Arakelova E., Hakobyan E., Hovakimyan A., Serobian A., Neves M., Ferreira J., Ferreira F., Zakaryan H. A new microtubule-stabilizing agent shows potent antiviral effects against African swine fever virus with no cytotoxicity. // Emerging Microbes and Infections. 2021; 10(1):783-796. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1902751>
3. Sahakvan H., Abelyan N., Arakelov V., Arakelov G., Nazaryan K. *In silico* study of colchicine resistance molecular mechanisms caused by tubulin structural polymorphism. // PLoS one. 2018; 14(8):e0221532:1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221532>
4. Sahakvan H., Arakelov G., Nazaryan K. *In silico* search for tubulin polymerization inhibitors. // Molecular Biology (Moscow). 2018; 52(4):604-608. <https://doi.org/10.1134/S0026893318040179>
5. Саакян А. Новые ингибиторы полимеризации тубулина. *In silico* исследования. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Россия, Москва, 10-14 апреля, 2017, с. 1-2.

ՍԱՀԱԿՅԱՆ ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆ ԿԱՐԱՊԵՏԻ

ՏՈՒԲՈՒԼԻՆԻ ՀԵՏ ԿՈՒԽԻՑԻՆԻ ԵՎ ԴՐԱ ԱՆԱԼՈԳՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄՆԵՐԸ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ միկրոխողովակներ, տուբուլինի պոլիմերիզացման արգելակիչներ, կոլխիցինի կապման կենտրոն:

Միկրոխողովակները բջջային կմախքի կարևոր մաս են և ներգրավված են բջջային պրոցեսների լայն շրջանակում, այդ թվում՝ քրոմոսոմների տարանջատում, բջիջների կառուցվածքի ձևավորում, ներբջջային տրանսպորտ և այլ: Տուբուլինը, որը բաղկացած է α և β -ենթամիավորներից, միկրոխողովակների հիմնական բաղադրիչն է: ԳԵՖ և մագնեզիումի առկայության պայմաններում տուբուլինի հետերոդիմերները պոլիմերիզացվում են և ձևավորում են միկրոխողովակներ: Կոլխիցինը և դրա անալոգները կապվելով տուբուլինի β -ենթամիավորի հետ արգելակում են տուբուլինի պոլիմերիզացման գործընթացը: Վերջին տարիներին տուբուլին-կոլխիցին փոխազդեցությունը ակտիվ ուսումնասիրվել է տարբեր մեթոդներով և առաջարկվել են մի քանի մոլեկուլային մեխանիզմներ, որոնք բացատրում են տուբուլինի պոլիմերիզացման արգելակումը: Այնուամենայնիվ, տուբուլինի պոլիմերիզացման արգելակման մասին ոչ բոլոր նրբություններն են հայտնի, օրինակ՝ մինչ օրս պարզ չէ, թե ինչպես է կոլխիցինը ազդում տուբուլինի երկու ենթամիավորների փոխազդեցության ազատ էներգիայի վրա:

Այս հարցին պատասխանելու համար մենք ուսումնասիրել ենք տուբուլին-կոլխիցին կոմպլեքսը օգտագործելով մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլացիաներ և MMPBSA ազատ կապման էներգիայի հաշվարկման մեթոդը: Մեր հաշվարկների արդյունքները ցույց են տալիս, որ կոլխիցինը գործում է որպես սպիտակուց-սպիտակուցային փոխազդեցության արգելակիչ և խաթարում է տուբուլինի α և β -ենթամիավորների միջև փոխազդեցությունը: Մենք ցույց ենք տվել, որ կոնֆորմացիոն փոփոխությունները, որոնք տեղի են ունենում կոլխիցինի կապման ժամանակ, ազդում են β -ենթամիավորի էլեկտրաստատիկ մակերեսին՝ դարձնելով այն ավելի էլեկտրաբացասական: Այս փոփոխությունները նվազեցնում են տուբուլինի ենթամիավորների միջև կապման ազատ էներգիան, քանի որ ԳԵՖ/Mg կոմպլեքսը, որը գտնվում է β -ենթամիավորի հարևանությամբ, նույնպես բացասական է լիցքավորված, հետևաբար երկու նման լիցքավորված մակերեսները վանում են իրար: Նույն երևույթը դիտարկվել է պողոֆիլոտոքսինի, կոմբրետաստատինի և նոկոդազոլի մոտ: Դա հիմք է հանդիսանում ենթադրելու, որ

կոլիսիցինը և դրա անալոգները խաթարում են փոխազդեցության ազատ էներգիան տուբուլինի ենթամիավորների միջև և ունեն ընդհանուր ազդեցության մոլեկուլային մեխանիզմ:

Բացի այդ, ուսումնասիրվել է կոլիսիցինի կապման սայթում տուբուլինի գենի որոշ եզակի նուկլոտիդների պոլիմորֆիզմներով պայմանավորված ամինաթթուների փոփոխությունների ազդեցությունը: Մենք ենթադրել ենք, որ այս տիպի փոփոխությունները կապման սայթում կարող են կոլիսիցինի ռեզիստենտության պատճառ հանդիսանալ: Այդ ենթադրությունը հիմք ընդունելով՝ մենք մոդելավորել ենք 7 ամինաթթվային փոխարինումներ կոլիսիցին կապող սայթում և գնահատել ենք կապման ազատ էներգիան կոլիսիցինի և տուբուլինի միջև: Մեր հաշվարկների համաձայն, երկու փոփոխություն՝ A248T և M257V բերում են նրան, որ կոլիսիցինի խնամակցությունը տուբուլինի նկատմամբ նվազում է մոտ երկու անգամ, համեմատած նատիվ տուբուլինի հետ: Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ որոշ ամինաթթուների փոխարինումները բերում են կապման էներգիայի նվազեցման, մենք ենթադրում ենք, որ տուբուլինի կառուցվածքային պոլիմորֆիզմները կարող են լինել կոլիսիցինի ռեզիստենտության պատճառներից մեկը:

Ի վերջո, մենք ստեղծել ենք նոր ալգորիթմ տուբուլինի հետերոդիմերի նման բազմակոմպոնենտ կոմպլեքսներում ազատ կապման էներգիան հաշվարկելու համար: Ալգորիթմը հիմնված է MM/PB(GB)SA մեթոդների վրա և կարող է օգտագործվել ինչպես լիզանդներ պարունակող երկու սպիտակուցների միջև կապման էներգիան հաշվարկելու համար, այնպես էլ՝ մեկ սպիտակուցի և մեկ լիզանդի համար: Բացի այդ, ի տարբերություն մոլեկուլային դինամիկայի վրա հիմնված նմանատիպ հաշվարկների, ալգորիթմը կարող է ողջամիտ ժամանակահատվածում գնահատել հազարավոր մոլեկուլների կապման էներգիան: Ալգորիթմի վավերացումը կատարվել է օգտագործելով ապացուցված ակտիվ մոլեկուլներ և ոչ ակտիվ մոլեկուլներ, որոնք ընդամենը կրկնօրինակում են ակտիվ մոլեկուլների ֆիզիկաքիմիական հատկությունները, բայց տարբերվում են քիմիական կառուցվածքով և միանշանակ չեն փոխազդում հետազոտվող թիրախի հետ: Մեր համեմատական ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ ալգորիթմը ավելի ճշգրիտ է տարբերակում իրական դրական կամ կեղծ դրական արդյունքները:

Հետազոտության արդյունքները բացահայտում են տուբուլինի պոլիմերիզացման վրա ինհիբիտորների ազդեցության մեխանիզմները: Ուսումնասիրված մոլեկուլային մեխանիզմները, ինչպես նաև մշակված ալգորիթմը կարող են լայն գործնական կիրառություն ունենալ և հիմք հանդիսանալ տուբուլինի պոլիմերիզացման նոր առավել արդյունավետ ինհիբիտորների դիզայնի համար:

MOLECULAR MECHANISMS OF COLCHICINE AND ITS ANALOGS
INTERACTION WITH TUBULIN

SUMMARY

Keywords: microtubules, tubulin polymerization inhibitors, colchicine binding site.

Microtubules are an important part of the cellular cytoskeleton and are involved in a wide range of cellular processes, including chromosome segregation, cell morphogenesis, and intracellular transport. Tubulin, consisting of α and β -subunits, is the main component of microtubules. In the presence of GTP and Mg, tubulin heterodimers polymerize and form microtubules. The polymerization process can be inhibited with colchicine and its analogs which bind to the β -subunit of tubulin. In recent years, tubulin-colchicine interaction has been intensively studied using different methods, and several molecular mechanisms of tubulin polymerization inhibition have been proposed. Nevertheless, many details of the tubulin polymerization inhibition molecular mechanisms remain unclear. For instance, by this day it is not clear how the colchicine binding changes the interaction free energy between tubulin subunits.

To address this question, we investigated the tubulin-colchicine complex using molecular dynamics simulations and the MMPBSA free energy calculation method. The results of our calculations demonstrate that colchicine acts as a protein-protein interaction inhibitor and weakens the interaction between tubulin α and β subunits. We showed that conformational rearrangements upon colchicine binding change the electrostatic surface of the β -tubulin and make it more electronegative. These changes reduce the binding free energy between tubulin subunits, since the GTP/Mg complex, located in front of the β -subunit, is also electronegative, as far as two surfaces with the same charge repulse each other. The same behavior was observed for several other colchicine analogs (podophyllotoxin, combretastatin, and nocodazole). Thus, this observation gives grounds to assume that colchicine binding site inhibitors reduce the

interaction free energy between tubulin subunits and have a common molecular mechanism of action.

Besides, the effect on amino acid substitutions in the colchicine binding site, caused by single nucleotide polymorphisms in the tubulin gene, was investigated. We assumed that this kind of changes in the binding site can be the reason for colchicine resistance. With this in mind, we modeled 7 amino acid substitutions in the colchicine binding site and estimated the binding free energy between tubulin dimer and colchicine. According to our calculations, two substitutions A248T and M257V weaken the binding affinity of colchicine approximately twofold compared to the native tubulin. Based on this, we propose that tubulin structural polymorphism can be one of the reasons for colchicine resistance.

Finally, we developed a new algorithm for free energy calculations in multicomponent complexes like tubulin heterodimer. The algorithm is based on MM/PB(GB)SA methods and can be used to calculate binding energy between two proteins, that are in complex with other small molecules or simply between a protein and a ligand. Moreover, the algorithm can be used for a high-throughput estimation of the binding energy of thousands of molecules, in contrast to analogical calculations based on molecular dynamics. Validation of the algorithm was done on a set of experimentally proven active molecules and decoys, which just imitate the physicochemical properties of the active molecules, but have different scaffolds. Our benchmark studies demonstrated that the developed algorithm is more accurate than traditional docking programs and better distinguishes true or false-positive results.

The results of this study shed a light on the fundamental mechanisms of action of tubulin polymerization inhibitors. Molecular mechanisms studied in this study, as well as the developed algorithm, can have a wide practical application and form the basis for the design of novel more effective analogs of colchicine.

