

УДК 004.75:004.942

**КАРПОВ П.А., ДЕМЧУК О.М.✉, РАЄВСЬКИЙ О.В., ОЖЕРЕДОВ С.П., СПІВАК С.І., САМОФАЛОВА Д.О., БЛЮМ Я.Б.**Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,  
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

✉ demom79@gmail.com, (098) 951-69-77

**ЗАСТОСУВАННЯ ВИСОКОПРОПУСКНОГО ВІРТУАЛЬНОГО СКРИНІНГУ В ГРІД  
ДЛЯ ПОШУКУ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ ТУБУЛІНУ ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ**

**Мета.** Відібрати нові перспективні інгібітори тубуліну фітопатогенних грибів за допомогою високопропускнуго віртуального скринінгу в Грід. **Методи.** Моделювання просторової структури цільових білків (I-Tasser, Грід) і лігандів, створення і скринінг віртуальних бібліотек (UCSF Dock 6, Грід), молекулярний докінг (CCDC Gold), обрахунок молекулярної динаміки (Gromacs, Грід). **Результати.** Побудовано 240 3D-моделей молекул тубуліну 82  $\alpha$ -, 111  $\beta$ - і 47  $\gamma$ -тубуліну, що належать 62-м видам фітопатогенних грибів. Встановлено, що похідні імідазолу мали найбільшу спорідненість з молекулами  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліну. Визначено, що серед ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну фітопатогенних грибів найбільшою потенціальною мішенню фунгіцидів є сайт зв'язування таксолу молекул  $\beta$ -тубуліну. Відібрано 50 речовин-лідерів, що мають спорідненість із ГТФ/ГДФ-обмінним сайтом (23 сполуки) і сайтом зв'язування таксолу (27 сполук). **Висновки.** Визначено, що серед ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну фітопатогенних грибів найбільший потенціал має сайт зв'язування таксолу на поверхні молекул  $\beta$ -тубуліну. Найбільша спорідненість була визначена для похідних імідазолу F0478-0219, F0478-0166 і  $\beta$ -тубуліну *Puccinia graminis f. sp. tritici*, а також F0478-0385 і  $\beta$ -тубуліну *Magnaporthe oryzae*.

**Ключові слова:** фітопатогенні гриби, фунгіциди, тубулін, віртуальний скринінг, Грід.

Царство Грибів налічує близько 100 тис. видів, переважна більшість яких є сапрофітами, але існує ряд видів, які в ході еволюції обрали паразитичний тип існування. Понад 10 тис. видів грибів паразитують на рослинах, і лише близько 1 тис. видів вражають тварин і людину [1, 2]. Враховуючи масштаби збитків на полях і втрати готової продукції, моніторинг, контроль і

боротьба з грибними інфекціями здійснюється окремими державними та міжнародними установами. За актуальним станом, найбільшу шкоду в Україні завдають представники відділів Ascomycetes (*Fusarium* spp., *Thielaviopsis* spp., *Magnaporthe grisea*), Basidiomycetes (*Phakospora pachyrhizi*, *Puccinia* spp.) і Oomycetes (*Pythium* spp., *Phytophthora* spp) [1].

Зв'язок грибів із рослинами склався ще на ранніх етапах їх еволюції. Ферментативний апарат грибів налаштовано на розкладання вуглеводів – головних будівельних матеріалів і запасних поживних речовин рослин. Тому рослини не лише мішені паразитичних грибів, але і сапротрофні гриби живляться рештками рослин. Унаслідок цього фітопатогенні гриби здатні значно впливати на макроморфогенез рослин і тим самим перешкоджати їх продуктивності [2].

Слід зауважити, що, незважаючи на наявність значної кількості фунгіцидних препаратів, потенціал тубуліну як молекулярної мішені у галузі фітопатології практично не розкрито. Наш підхід ґрунтується на пошуку фунгіцидних речовин, здатних діяти безпосередньо на мітохондріальний апарат фітопатогенних грибів, а саме на головний білок мікротрубочок і центрів їх первинної організації – тубулін.

Тому головною метою дослідження було поєднання і використання методів структурної біоінформатики і обчислень у Грід для масштабного віртуального пошуку інгібіторів клітинного поділу у фітопатогенних грибів.

**Матеріали і методи**

За результатами аналізу бази даних «UniProtKB» (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) було відібрано 240 амінокислотних послідовностей  $\alpha$ -,  $\beta$ -, та  $\gamma$ -тубулінів фітопатогенних грибів [3]. Відповідні тривимірні моделі було побуду-

---

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

довано за допомогою інструмента I-TASSER [4], встановленого на обчислювальному Грід-кластері Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН України. Попередня оцінка побудованих моделей виконувалася на підставі внутрішніх оціночних функцій програми I-Tasser: C-score і TM-score [4]. Оптимізація моделей виконувалася шляхом 1 нс молекулярної динаміки в Gromacs (силове поле amber 03) [5]. Геометрія оптимізованих моделей перевірялася за допомогою сервісів MolProbity [6] і Anolea [7]. Додаткову оптимізацію геометрії зв'язків та двограних кутів обраних моделей здійснювали за скороченим протоколом, що передбачав лише мінімізацію енергії [5]. Оптимізація контактних поверхонь сайтів була виконана за допомогою класичних алгоритмів мінімізації енергії (Steepest descent та Conjugate gradient) програмного пакета Gromacs (силові поля ff amber99 і G43a6). Час стандартної релаксації окремої білкової молекули складав 1 нс [5].

На етапі підготовки мішеней було виконано візуальний аналіз тривимірного вирівнювання сайтів зв'язування лігандів у побудованих моделях і контрольної структури. У якості контролю було використано структуру 1JFF [8] з RCSB Protein Data Bank. Побудовані 3D-моделі було ранжировано за подібністю. Для подальшої роботи було відібрано по 5 моделей із кожного кластера на підставі візуальної оцінки топології ключових залишків сайтів зв'язування.

Просторові структури лігандів розраховували із врахуванням результатів обчислення парціальних зарядів, визначених за допомогою інструмента AM1-bcc програми Морас7 [9, 10]. Попередній відбір лігандів здійснювали за фізико-хімічними параметрами (Rule of 5, ADMET, PAINS) та за результатами QSAR [11]. Підготовку контактних поверхонь і генерацію електростатичних карт мішеней для наступного скринінгу в UCSF Dock 6 було виконано в програмі UCSF Chimera [12]. Первинний скринінг лігандів було виконано на обчислювальному кластері Інституту з використанням програми UCSF Dock 6 [9]. Для 50-ти найкращих лігандів було виконано результуючий докінг із використанням локального пакета CCDC Gold [13]. Остаточний відбір перспективних сполук було проведено на підставі оціночних функцій CCDC Gold: ASP, GoldScore та ChemScore, а також за результатами візуального аналізу побудованих комплексів після етапу короткотривалої молекулярної динаміки тривалістю 2 нс – оцінки водневих

зв'язків і гідрофобних взаємодій.

Моделювання в I-Tasser, обрахунок молекулярної динаміки (Gromacs і Amber Tools) і докінг засобами UCSF Dock 6 виконували на обчислювальному кластері Віртуальної Організації CSLabGrid (IFBG Cluster).

### Результати та обговорення

У результаті аналізу бази даних «UniProtKB» було відібрано 240 послідовностей молекул тубуліну, що належать 62-м видам фітопатогенних грибів з родів *Aspergillus*, *Botrytis*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Gibberella*, *Magnaporthe*, *Magnaportheiopsis*, *Marssonina*, *Rhynchosporium*, *Sclerotinia* та *Thielaviopsis* типу Ascomycota; *Anthracocestis*, *Ceraceosorus*, *Melampsora*, *Melanopsichium*, *Microbotryum*, *Mixia*, *Phakopsora*, *Puccinia*, *Sporisorium*, *Uromyces* і *Ustilago* типу Basidiomycota; а також родам *Mucor* і *Rhizopus* типу Zygomycota. На наступному етапі за допомогою програми I-Tasser було побудовано структурні моделі молекул 82-ми  $\alpha$ -, 111-ти  $\beta$ - і 47-ми  $\gamma$ -тубулінів. Якість побудованих моделей була підтверджена на підставі показників C-score і TM-score сервісу I-Tasser,  $\phi$ - і  $\psi$ -кутів, відстаней, показників енергії, а також за допомогою сервісів MolProbity і Anolea.

Попередні дослідження x-Ray структур довели, що зв'язування гетероциклічних сполук на поверхні молекул тубулінів може здійснюватися за чотирма пріоритетними сайтами: 1) GTP/GSP; 2) TZT; 3) HOS/T131 і 4) Taxol [14]. Для високопропускного молекулярного скринінгу сполук із фунгіцидною дією нами було використано ГТФ/ГДФ-обмінний сайт і сайт зв'язування таксолу.

На етапі підготовки мішеней до скринінгу було виконано візуальний аналіз просторового вирівнювання сайтів зв'язування у побудованих моделях. Після етапу оптимізації геометрії в силовому полі amber99 було виконано структурне вирівнювання і кластеризацію мішеней за подібністю. У якості контролю було використано шаблонну PDB-структуру 1JFF  $\beta$ -тубуліну з *Bos taurus*. Вирівнювання проводилося з врахуванням RMSD за Ca-атомами між контрольною структурою і моделями. Моделювання сайтів зв'язування лігандів проводили на підставі відбудованих карт поверхні Коннеллі, карти взаємодій, а також ступеня гомології із відповідним шаблоном. Враховуючи значну консервативність 3D-структур молекул тубулінів, для

подальшого докінгу було відібрано по 5 моделей із кожної групи, отриманих під час кластеризації 3D-моделей. Водночас було встановлено, що надзвичайно перспективний сайт зв'язування таксолу у  $\alpha$ - і  $\gamma$ -тубулінів фітопатогенних грибів містить варіабельну петлю, яка, на нашу думку, може спричиняти перешкоду для доступу лігандів до сайту (рис. 1).

Порівняння контрольної структури та реконструйованих моделей визначило достатню гомологію і рівномірне розташування ідентичних залишків, щоправда, у ділянці GTP-зв'язуючого сайту кількість схожих залишків була вищою. При цьому всі зміни стосувалися більше структурних елементів, а не функціональних амінокислот. Слід зазначити, що неідентичні амінокислотні залишки все одно належали до спільних груп за фізико-хімічними властивостями, що значно знижує перспективність цього сайту. На нашу думку, така консервативність ГТФ/ГДФ-обмінного сайту значно зменшує його перспективність як потенційної мішені фунгіцидних препаратів.

Для остаточної підготовки мішеней до молекулярному докінгу було виконано оптимізацію робочих поверхонь сайтів із використанням алгоритмів мінімізації енергії 'Steep descent' та 'Conjugate gradient'. Також у силовому полі G43аб було досягнуто вирівнювання довжин зв'язків, двогранних кутів та зникнення перекривання атомів. Бібліотека лігандів була підготовлена згідно з методологією, описаною в розділі «Матеріали і методи».

Як було зазначено, ядром системи віртуального скринінгу була програма UCSF Dock 6,

що поєднує достатню швидкість обрахунку і точність відбору перспективних сполук. Алгоритм Dock передбачає фіксацію найбільш жорсткої частини ліганду в певному місці сайту і поточергове обертання та зміщення інших частин ліганду відносно «якоря». Також під час докінгу враховуються парціальні заряди на атомах лігандів.

Для 50-ти найкращих лігандів, відібраних за алгоритмом UCSF Dock, було виконано результуючий докінг із використанням локального пакета CCDC Gold. Найкращі ліганди були відібрані за показниками оціночних функцій ASP, GoldScore, ChemScore і візуального аналізу побудованих комплексів, який полягав у порівнянні орієнтації функціональних груп мішені і лігандів. Слід зауважити, що найбільша спорідненість була визначена у випадку похідних імідазолу, зв'язаних з  $\alpha$ - і  $\beta$ -тубуліном. Загалом було відібрано 50 речовин-лідерів: 27 сполук, що мають спорідненість до сайту зв'язування таксолу (B0007, B0070, B0080, B0119, B0130, B0143, B0147, B0152, B0168, B0206, B0244, B0254, B0261, B0306, B0313, B0363, F0478-0143, F0478-0214, F0478-0265, F0478-0271, F0478-0272, F0478-0273, F0478-0385, F0478-0465, F0478-0477, F0478-0479 і F1081-0015), і 23 сполуки, що мають спорідненість до ГТФ/ГДФ-обмінного сайту (B0007, B0013, B0014, B0033, B0066, B0087, B0093, B0114, B0129, B0135, B0143, B0147, B0152, B0194, B0206, B0313, F0442-0038, F0478-0231, F0478-0271, F0478-0273, F0478-0295, F0478-0478 і F0478-0479) тубулінів фітопатогенних грибів.

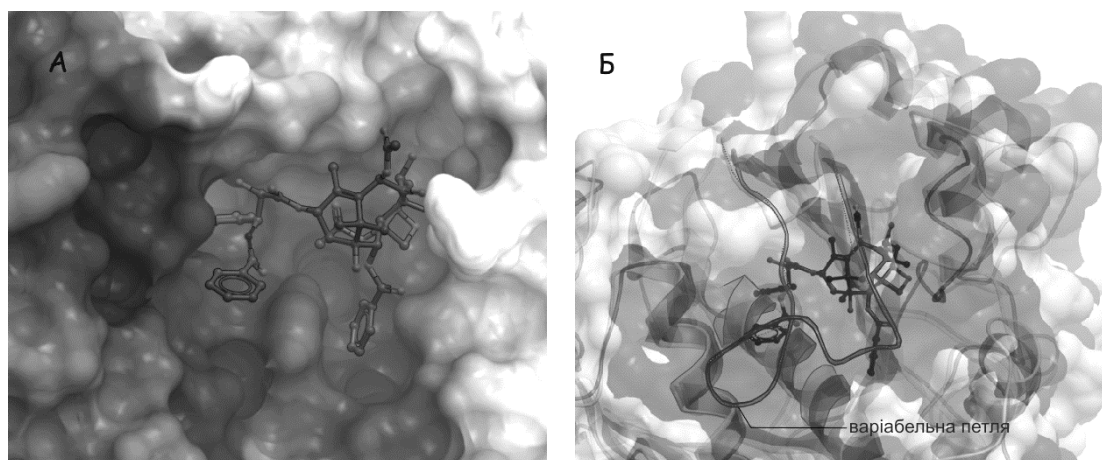


Рис. 1. Встановлено, що сайт зв'язування таксолу у фітопатогенних грибів є надзвичайно перспективним через свою потенційну селективність (А), але містить варіабельну петлю (Б), яка може перекривати доступ для лігандів. На рисунку Б наведено результати структурного накладання поверхні  $\beta$ -тубуліну *Magnaporthe oryzae* і структурної моделі  $\alpha$ -тубуліну із *Magnaporthe oryzae*.

На підставі результатів високопропускнуго віртуального скринінгу, молекулярного докінгу і структурного аналізу можна зробити висновок, що серед ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну фітопатогенних грибів найбільший потенціал зв'язування похідних імідазолу має таксольний сайт на поверхні молекули  $\beta$ -тубуліну. Загалом докінг у таксол-зв'язуючий сайт  $\beta$ -тубуліну визначив найбільшу спорідненість сполук F0478-0219, F0478-0166 і  $\beta$ -тубуліну *Puccinia*

*graminis f. sp. tritici*, а також сполуки F0478-0385 і  $\beta$ -тубуліну з *Magnaporthe oryzae* (рис. 2). Вищезазначені сполуки розглядаються нами як найбільш перспективні лідери.

У випадку ГТФ/ГДФ-обмінного сайту тубуліну найбільша спорідненість ліганду і мішені біла визначена у випадку сполук F0478-0265, B0367 і  $\alpha$ -тубуліну, а також сполук B0066, F0478-0271, B0114 і  $\beta$ -тубуліну з *Puccinia triticina*.

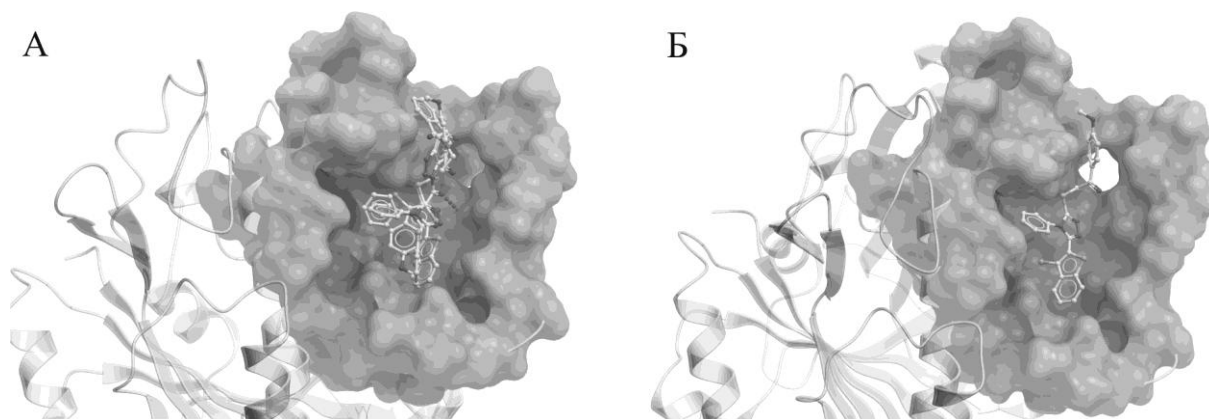


Рис. 2. Результати молекулярного докінгу сполук-лідерів у сайт зв'язування таксолу на поверхні молекул  $\beta$ -тубуліну фітопатогенних грибів. А –  $\beta$ -тубулін *Puccinia graminis f. sp. tritici* та F0478-0219, F0478-0166; Б –  $\beta$ -тубулін *Magnaporthe oryzae* та F0478-0385. Білки показано стрічковою моделлю з відображенням поверхні сайту зв'язування, ліганди представлені кульково-паличковими структурами, забарвлені за елементами.

### Висновки

За результатами високопропускнуго віртуального скринінгу, молекулярного докінгу і структурного аналізу було визначено, що серед ізотипів  $\alpha$ -,  $\beta$ - і  $\gamma$ -тубуліну фітопатогенних грибів найбільший потенціал зв'язування гетероциклічних сполук має сайт зв'язування таксолу на поверхні молекул  $\beta$ -тубуліну.

У результаті докінгу лігандів у таксол-зв'язуючий сайт  $\beta$ -тубуліну визначено найбільшу спорідненість похідних імідазолу F0478-0219, F0478-0166 і  $\beta$ -тубуліну *Puccinia graminis f. sp. tritici*, а також F0478-0385 і  $\beta$ -тубуліну *Magnaporthe oryzae*.

За результатами молекулярного докінгу сполук-лідерів у ГТФ/ГДФ-обмінний сайт тубу-

ліну, найбільша спорідненість ліганду і мішені спостерігається у випадку сполук F0478-0265, B0367 і  $\alpha$ -тубуліну, а також сполук B0066, F0478-0271, B0114 і  $\beta$ -тубуліну із *Puccinia triticina*.

Робота виконувалася за підтримки Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування Грід-технологій Національного Українського Грїда (УНГ, <http://grid.nas.gov.ua>) та проєктів комплексної програми наукових досліджень НАН України «Грїд-інфраструктура і Грїд-технології для наукових і науково-прикладних застосувань».

У рамках дослідження була використана віртуальна бібліотека лігандів, що була створена на основі колекції похідних імідазолу, синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України.

### Література

1. Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Pietro A.D., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2012. Vol. 13 (4). P. 414–430.
2. Oliveira Junior E.N., Gueddari N.E., Moerschbacher B.M., Franco T.T. Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. *Braz. J. Microbiol.* 2012. Vol. 43 (2). P. 800–809.
3. The UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucl. Acids Res.* 2015. Vol. 43 (D1). P. D204–D212.
4. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5 (4). P. 725–738.

5. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29 (7). P. 845–854.
6. Chen V.B., Arendall W.B. 3rd, Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.* 2010. Vol. 66 (Pt 1). P. 12–21.
7. Melo F., Feytmans E. Assessing Protein Structures with a Non-local Atomic Interaction Energy. *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 277 (5). P. 1141–1152.
8. Löwe J., Li H., Downing K.H., Nogales E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2001. Vol. 313 (5). P. 1045–1057.
9. Allen W.J., Balius T.E., Mukherjee S., Brozell S.R., Moustakas D.T., Lang P.T., Case D.A., Kuntz I.D., Rizzo R.C. DOCK 6: impact of new features and current docking performance. *J. Comput. Chem.* 2015. Vol. 36 (15). P. 1132–1156.
10. Stewart J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* 2013. Vol. 19 (1). P. 1–32.
11. Baell J.B., Holloway G.A. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J. Med. Chem.* 2010. Vol. 53 (7). P. 2719–2740.
12. Huang C.C., Couch G.S., Pettersen E.F., Ferrin T.E. Chimera: an extensible molecular modeling application constructed using standard components. *Pacific Symp. on Biocomputing*. 1996. Vol. 1. P. 724.
13. Jones G., Willett P., Glen R.C., Leach A.R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 1997. Vol. 267 (3). P. 727–748.
14. Karpov P.A., Demchuk O.M., Britsun V.M., Lytvyn D.I., Pydiura M.O., Rayevsky O.V., Samofalova D.O., Spivak S.I., Volochnyuk D.M., Yemets A.I., Blume Ya.B. New imidazole inhibitors of mycobacterial FtsZ: the way from high-throughput molecular screening in grid up to in vitro verification. *Nauka innov.* 2016. Vol. 12 (3). P. 44–59.

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

*Institute of Food Biotechnology and Genomics of Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovs'kogo str., 2A, e-mail: demom79@gmail.com*

#### **A HIGH-THROUGHPUT VIRTUAL SCREENING IN GRID FOR NEW TUBULIN-TARGETED INHIBITORS OF PLANT FUNGAL PATHOGENS**

**Aim.** To select new tubulin-targeted inhibitors of plant fungal pathogens based on results of high-throughput virtual screening in Grid. **Methods.** Protein and ligand spatial structure modelling (I-Tasser, Grid), design and virtual screening ligands library (UCSF Dock 6, Grid), molecular docking (CCDC Gold), molecular dynamics simulation (Gromacs, Grid). **Results.** 240 structural models of tubulin molecules (82  $\alpha$ -, 111  $\beta$ - and 47  $\gamma$ -tubulin) from 62 species of phytopathogenic fungi were constructed. It was found that imidazole ligands, demonstrate strongest affinity to  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin. It was found that among  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -tubulin, taxol binding site of  $\beta$ -tubulin possess the strongest potential as the fungicidal drugs target. It was selected 50 leader compounds: 23 with affinity for GTP/GDF-exchange site and 27 with affinity for taxol-binding site. **Conclusions.** It was found, that in phytopathogenic fungi, taxol binding site of  $\beta$ -tubulin are the main fungicidal drug target (in compare to other tubulin site or isotype). The highest affinity was predicted for the compounds F0478-0219, F0478-0166 and  $\beta$ -tubulin from *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici*, as well as for the compound F0478-0385 and  $\beta$ -tubulin from *Magnaporthe oryzae*.

**Keywords:** pathogenic fungi, fungicides, tubulin, virtual screening, Grid.