

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.01.103>

УДК 615.277 : 004.94

І.В. Семенюта, В.Ю. Танчук, Є.О. Лобко, Л.О. Метелиця

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ

E-mail: ivan@bpci.kiev.ua

Молекулярний докінг похідних 1,3-оксазолу в активному центрі тубуліну

Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем

*Досліджено *in silico* вплив похідних 1,3-оксазолу на колхіцинзв'язуючий сайт (КЗС) β -тубуліну, проведено молекулярний докінг похідних 1,3-оксазолу в КЗС β -тубуліну та наведено результати аналізу ліганд-рецепторних комплексів. Створено адекватну модель КЗС Б-субодиниці β -тубуліну, яку перевірено редокінгом колхіцину в КЗС і отримано стабільний ліганд-білковий комплекс ($E_{зв} = -8,1$ ккал/моль, $RMSD = 1,2042$ Å). Методом молекулярного докінгу обґрунтовано високу цитотоксичну активність сполук **1**, **3** та **4**, які утворюють стійкі ліганд-білкові комплекси ($E_{зв} = -7,7, -5,5, -6,2, -5,8$ ккал/моль). Показано, що ці сполуки зв'язуються з амінокислотними залишками КЗС, подібно до колхіцину, за допомогою водневих зв'язків та π - σ зв'язків. Отримані результати дають підставу рекомендувати сполуки **1**, **3** і **4** для подальшого вивчення як перспективних антимітотичних агентів.*

Ключові слова: молекулярний докінг, тубулін, колхіцин, похідні 1,3-оксазолу.

В основі процесу утворення в організмі злоякісних пухлин лежить неконтрольований поділ клітин внаслідок пошкодження структури їх ДНК. Тому дія більшої частини відомих протипухлинних хімотерапевтичних засобів спрямована на пригнічення стадії мітозу атипових клітин організму. Однією з молекулярних мішеней відомих протипухлинних сполук вважається білок тубулін та побудовані з нього мікротрубочки, які відіграють ключову роль у процесі поділу клітин [1].

Відомо, що такі протипухлинні засоби, як колхіцин і алкалоїди барвінку, блокують мітоз клітин шляхом зв'язування з різними ділянками тубуліну та інгібуванням процесу збирання мікротрубочок [2], а таксани — таксол і таксотер — підсилюють неконтрольовану полімеризацію тубуліну [3]. Таксол і таксотер, незважаючи на їх високу вартість та отримання напівсинтетичним шляхом, широко використовуються при лікуванні найпоширеніших злоякісних пухлин завдяки високій ефективності. Колхіцин та його похідні є більш доступними і мають спрощену структуру, але є надто токсичними для клінічного використання.

Одним із перспективних класів інгібіторів тубуліну вважаються азотовмісні гетероциклічні сполуки, в тому числі похідні оксазолу, тіазолу та бензімідазолу [4].

© І.В. Семенюта, В.Ю. Танчук, Є.О. Лобко, Л.О. Метелиця, 2017

У наших попередніх дослідженнях на основі створених прогнозуючих QSAR моделей інгібіторів тубуліну [5] було передбачено інгібіторну активність і проведено детальне вивчення похідних 1,3-оксазолу на культурі клітин HEP-2 [6].

У цій роботі наведено результати молекулярного докінгу похідних 1,3-оксазолу в коліцинзв'язуючий сайт (КЗС) β -тубуліну і проведено аналіз ліганд-рецепторних комплексів 2-((4-((4-хлорофеніл)сульфоніл)-2-(тіофен-2-іл)оксазол-5-іл)тіо)-*N*-(3,5-диметилфеніл)-ацетамід (**1**), 2-(*n*-толіл)-4-(5-(*n*-толіламіно)-1,3,4-тіадіазол-2-іл)оксазол-5-амін (**3**) та 5-морфоліно-2-фенілоксазол-4-карбоксамід (**4**), як найбільш перспективних інгібіторів тубуліну [5, 6].

Матеріали та методи. Програму AutoDock [7] використовували з огляду на її широкі можливості для дослідження структури активних центрів білків, вивчення процесів зв'язування лігандів з білками, адекватної оцінки структурної та хімічної компліментарності білків з лігандами та отримання енергетичних параметрів зв'язування ліганду в комплексі з білком.

Програму AutoDock Tools (ADT) (ver. 1.5.6) [8] застосовували для отримання відповідного формату структур білка та ліганду і створення «grid box». Як вихідну структуру використовували кристалічну структуру ДАМА-колхіцин-тубулінового комплексу з Бруксгейвенського банку даних структур (PDB код 1SA0) [9]. В експерименті використовували КЗС Б-субодиниці β -тубуліну, який виділили із загальної структури та зберегли у вигляді pdb-файла за допомогою програми Pymol Viewer 1.7.0.1 [10].

У процесі підготовки макромолекули — Б-субодиниці β -тубуліну — з використанням програми ADT методом «noBondOrder» у її структурі залишили атоми водню тільки для полярних атомних груп. Усі атоми макромолекули були заново пронумеровані. Макромолекулу з доданими та розрахованими за методом Gasteiger парціальними зарядами зберігали у форматі PDBQT.

Структури лігандів створювали, оптимізували та зберігали у форматі Mol2 за допомогою програми ChemAxon Marvin Sketch 5.3.7 [11]. Парціальні заряди та торсії лігандів модифікували за допомогою програми ADT та зберігали також у PDBQT форматі.

Для підготовки карти «grid map» та створення боксу «grid box» використовували підпрограму AutoGrid. Центром боксу був розрахований центр ДАМА-колхіцину з координатами $x = 117,219$, $y = 90,180$, $z = 6,290$, зв'язаного з Б-субодиницею β -тубуліну. Навколо цього центру формували решітку (grid) на 40—40—40 точок з кроком (grid spacing) в 1,000 Å. Встановлені параметри є адекватними щодо центру зв'язування досліджуваних лігандів з макромолекулою та достатнього об'єму можливих ділянок зв'язування лігандів у КЗС.

Для безпосередньо докінгу використовували програму AutoDock Vina 1.1.2 [12]. Дослідження проводили на ПК з процесором Intel Core i3 (3.20 ГГц) з 2 ГБ оперативної пам'яті та операційною системою Windows XP SP3. Процес докінгу одного ліганду тривав близько 5 хв. Для візуалізації та аналізу результатів докінгу застосовували пакет програм Accelrys DS (ver. 2.5) [13].

Результати та обговорення. Для коректного порівняльного аналізу ефекту цитотоксичної дії обраних сполук — 2-((4-((4-хлорофеніл)сульфоніл)-2-(тіофен-2-іл)оксазол-5-іл)тіо)-*N*-(3,5-диметилфеніл)ацетаміду (**1**), (*R*)-5-((2-морфолінопропіл)аміно)-2-(*n*-толіл)оксазол-4-карбонітрилу (**2**), 2-(*p*-толіл)-4-(5-(*n*-толіламіно)-1,3,4-тіадіазол-2-іл)оксазол-5-аміну (**3**), 5-морфоліно-2-фенілоксазол-4-карбоксаміду (**4**), (*S*)-2-етил-5-((2-морфоліно-2-фенілетил)аміно)оксазол-4-карбонітрилу (**5**), (*S*)-5-((2-(диметиламіно)-2-(фуран-2-іл)етил)аміно)-2-

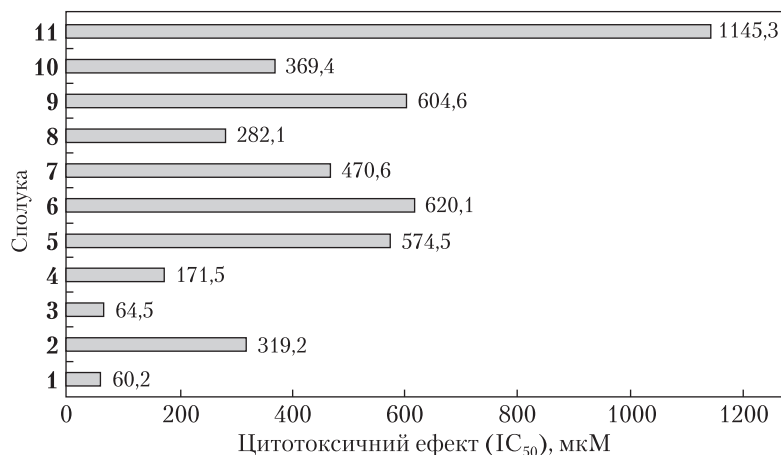


Рис. 1. Розрахований цитотоксичний ефект для сполук **1**, **3** і **4** у порівнянні з іншими інгібіторами тубуліну [6]

ізобутилоксазол-4-карбонітрилу (**6**), (*E*)-2-((3-аліл-4-оксо-2-тіооксотіазолідин-5-ілден)метил)-5-((4-метоксифеніл)аміно)оксазол-4-карбонітрилу (**7**), 5-((4-бромфеніл)сульфоніл)-2-(*трет*-бутил)оксазол-4-карбонітрилу (**8**), 2-(2-метоксифеніл)-5-(піперазин-1-іл)-4-тозилксазолу (**9**), *N*¹-(2-(4-ціано-5-(фенетиламіно)оксазол-2-іл)етил)-*N*²-фенетилфталаміду (**10**), (*S*)-5-((2-(диметиламіно)-2-(4-(диметиламіно)феніл)етил)аміно)-2-етилксазол-4-карбонітрилу (**11**), отриманого в попередніх роботах [5,6], показник СД₅₀ — цитотоксична доза досліджуваних сполук — був перерахований у значення ІС₅₀, як показник концентрації речовин для отримання 50 % інгібуючого ефекту на клітини НЕР-2 (рис. 1). Отриманий діапазон значень ІС₅₀ для сполук **1**, **3** і **4** — 60,2, 64,5 та 171,5 мкМ — засвідчив доцільність і перспективність проведення докінг-аналізу цих сполук як ефективних інгібіторів тубуліну.

На першому етапі досліджень для перевірки придатності обраної методики докінгу з використанням зазначених вище параметрів проведено редокінг ДАМА-колхіцину в КЗС тубуліну. Отримана структура найбільш стабільного комплексу ДАМА-колхіцину з білком мала енергію зв'язування –8,1 ккал/моль та значення RMSD = 1,2042 Å. При цьому молекула колхіцину утворювала водневий зв'язок з амінокислотним залишком (АЗ) CYS241 завдовжки 2,9 Å, а також π–σ зв'язок завдовжки 3,24 Å з АЗ LEU255. Висока енергія зв'язування утвореного комплексу свідчить про енергетично вигідну конформацію, а низьке значення RMSD — про близькість параметрів розташування молекули колхіцину в КЗС з його вихідним положенням. Утворення колхіцином нековалентних зв'язків з амінокислотами в КЗС, подібних до зв'язків у початковому ліганд-білковому комплексі, підтверджує адекватність параметрів докінгу та обраної макромолекули.

На другому етапі за допомогою програми ChemAxon Marvin Sketch та її методів оптимізації 3D структури було отримано по три різних конформації для сполук **1**, **3** і **4**, які були використані для докінгу. На рис. 2–4 проілюстровано молекулярний докінг досліджених сполук.

У результаті молекулярного докінгу сполуки **1** (див. рис. 2) був отриманий ліганд-білковий комплекс з енергією зв'язування –7,7 ккал/моль. Результати аналізу цього комплексу вказують на утворення водневого зв'язку між карбонільною групою сполуки **1** і АЗ LEU255 КЗС та π–σ зв'язку завдовжки 3,5 Å між ароматичним циклом сполуки **1** і АЗ LEU255, що є додатковим фактором стабілізації ліганд-білкового комплексу.

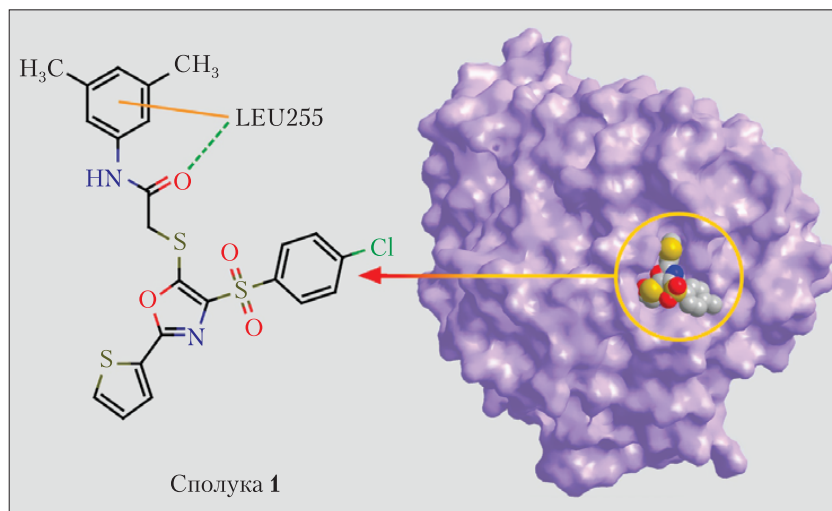


Рис. 2. Найбільш енергетично вигідний ліганд-білковий комплекс сполуки 1

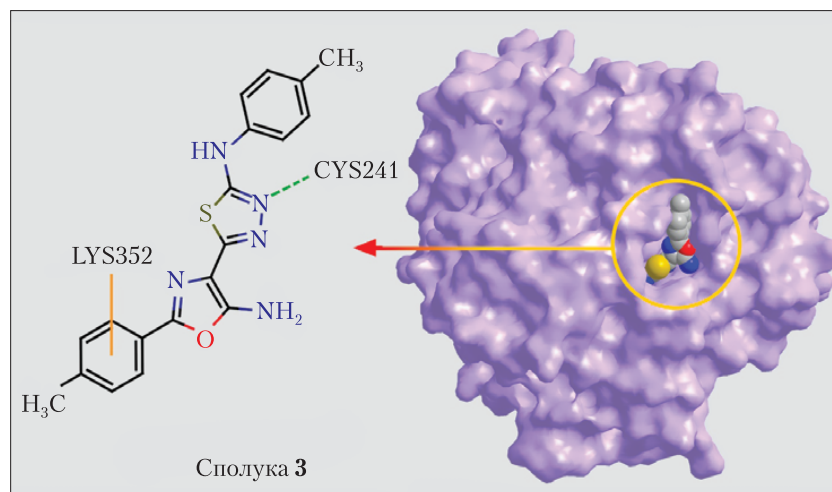


Рис. 3. Ліганд-білковий комплекс сполуки 3

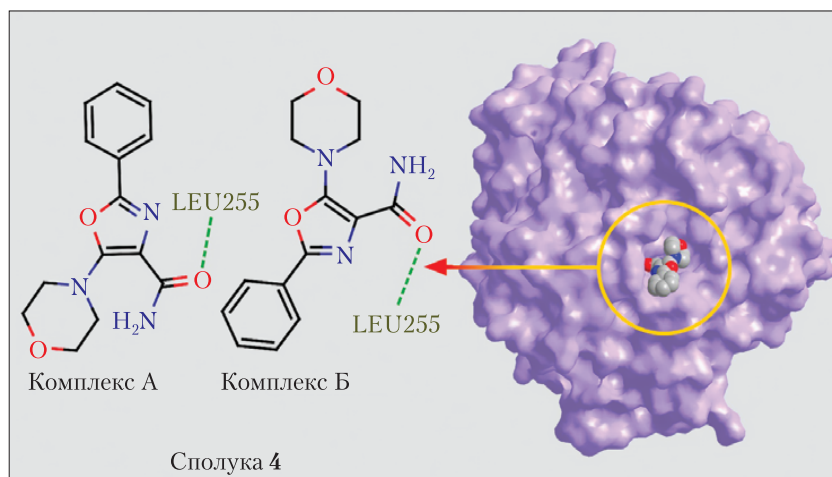


Рис. 4. Варіанти ліганд-білкового комплексу сполуки 4

Молекулярний докінг сполуки **3** свідчить про формування стійкого ліганд-білкового комплексу з енергією зв'язування $-5,5$ ккал/моль (див. рис.3). Аналіз цього комплексу виявив утворення водневого зв'язку завдовжки $3,2$ Å між тіадіазоловим циклом сполуки **3** і SH-групою A3 CYS241 КЗС та π - σ зв'язок завдовжки $5,8$ Å між ароматичним циклом ліганду і A3 LYS352 КЗС.

Дані докінгу сполуки **4** вказують на наявність водневих зв'язків завдовжки $3,0$ та $3,1$ Å між карбонільною групою сполуки **4** та A3 LEU255 КЗС. При цьому сполука **4** утворювала ліганд-білкові комплекси у двох конформаціях, що відрізнялися положенням сполуки **4** в КЗС на 180° – морфоліновою групою вглиб КЗС з енергією зв'язування $-6,2$ ккал/моль та назовні з енергією зв'язування з КЗС $-5,8$ ккал/моль.

Таким чином, досліджено *in silico* вплив похідних 1,3-оксазолу на КЗС β -тубуліну. Створено адекватну модель КЗС Б-субодиниці β -тубуліну, яку перевірено редокінгом колхіцину в КЗС та отримано стабільний ліганд-білковий комплекс з $E = -8,1$ ккал/моль та RMSD = $1,2042$ Å. Методом молекулярного докінгу обґрунтовано достатньо високу цитотоксичну активність сполук **1**, **3** та **4**, які утворюють стабільні ліганд-білкові комплекси з енергією зв'язування $-7,7$, $-5,5$, $-6,2$ і $-5,8$ ккал/моль відповідно. Показано, що ці сполуки зв'язуються з A3 КЗС, подібно до колхіцину, за допомогою водневих зв'язків та π - σ зв'язків. Отримані результати дають підставу рекомендувати сполуки **1**, **3** і **4** для подальшого вивчення як перспективних антимітотичних агентів.

Автори висловлюють вдячність співробітникам Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України д-ру хім. наук В.С. Броварцю, канд. хім. наук В.С. Зябреву та С.Г. Пільо за надані зразки хімічних сполук для дослідження.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – 4. – P. 253–265.
2. Bhattacharyya B., Panda D., Gupta S., Banerjee M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin // Med. Res. Rev. – 2008. – 1. – P. 155–183.
3. Kumar N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action // J. Biol. Chem. – 1981. – 20. – P. 10435–10441.
4. Lu Y., Chen J., Xiao M., Li W., Miller D. An Overview of Tubulin Inhibitors That Interact with the Colchicine Binding Site // Pharm. Res. – 2012. – 11. – P. 2943–2971.
5. Семенюта И.В., Ковалишин В.В., Коперник И.Н., Василенко А.Н., Прокопенко В.В., Броварец В.С. Создание QSAR моделей для поиска ингибиторов тубулина // Доп. НАН України. – 2013. – № 11. – С. 168–173.
6. Семенюта И.В., Ковалишин В.В., Пільо С.Г., Благодатный В.Н., Трохименко Е.П., Броварец В.С., Метелица Л.А. Использование QSAR моделей для поиска ингибиторов тубулина в ряду производных 1,3-оксазола // Доп. НАН України. – 2014. – № 12. – С. 152–157.
7. <http://autodock.scripps.edu/downloads>
8. <http://mglttools.scripps.edu/downloads>
9. <http://files.rcsb.org/download/1SA0.pdb>
10. <https://www.pymol.org/pymol>
11. <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch>
12. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // J. Comput. Chem. – 2010. – 31. – P. 455–461.
13. <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>

Надійшло до редакції 13.09.2016

REFERENCES

1. Jordan M.A., Wilson L. Nat. Rev. Cancer., 2004, **4**: 253–265.
2. Bhattacharyya B., Panda D., Gupta S., Banerjee M. Med. Res. Rev., 2008, **1**: 155-183.
3. Kumar N. J. Biol. Chem., 1981, **20**: 10435-10441.
4. Lu Y., Chen J., Xiao M., Li W., Miller D. Pharm. Res., 2012, **11**: 2943–2971.
5. Semenyuta I.V., Kovalishyn V.V., Kopernik I.N., Vasilenko A.N., Prokopenko V.V., Brovarets V.S. Dopov. NAN Ukraine, 2013, No 11: 168-173 (in Russian).
6. Semenyuta I.V., Kovalishyn V.V., Pilyo S.G., Blagodatnyy V.N., Trokhimenko E.P., Brovarets V.S., Metelitsa L.A. Dopov. NAN Ukraine, 2014, No 12: 152–157 (in Russian).
7. <http://autodock.scripps.edu/downloads>
8. <http://mgltools.scripps.edu/downloads>
9. <http://files.rcsb.org/download/1SA0.pdb>
10. <https://www.pymol.org/pymol>
11. <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch>
12. Trott O., Olson A.J. J. Comput. Chem., 2010, **31**: 455-461.
13. <http://accelrys.com/products/discovery-studio/>

Received 13.09.2016

I.V. Семенюта, В.Ю. Танчук, Е.А. Лобко, Л.А. Метелиця

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев
E-mail: ivan@bpci.kiev.ua

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3-ОКСАЗОЛА В АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ ТУБУЛИНА

Исследовано *in silico* влияние производных 1,3-оксазола на колхицинсвязывающий сайт (КСС) β -тубулина, проведён молекулярный докинг производных 1,3-оксазола в КСС β -тубулина и приведены результаты анализа лиганд-рецепторных комплексов. Создана адекватная модель КСС Б-субъединицы β -тубулина, которая проверена редокингом колхицина в КСС и получен стабильный лиганд-белковый комплекс ($E_{cb} = -8,1$ ккал/моль, RMSD = 1,2042 Å). Методом молекулярного докинга обоснована высокая цитотоксическая активность соединений **1**, **3** и **4**, которые образуют устойчивые лиганд-белковые комплексы ($E_{cb} = -7,7$, $-5,5$, $-6,2$, $-5,8$ ккал/моль). Показано, что эти соединения связываются с аминокислотными остатками КСС, подобно колхицину, с помощью водородных связей и π - σ связей. Полученные результаты позволяют рекомендовать соединения **1**, **3** и **4** для дальнейшего изучения в качестве перспективных антimitотических агентов.

Ключевые слова: молекулярный докинг, тубулин, колхицин, производные 1,3-оксазола.

I.V. Semenyuta, V.Yu. Tanchuk, E.O. Lobko, L.O. Metelytsia

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: ivan@bpci.kiev.ua

MOLECULAR DOCKING OF 1,3-OXAZOLE DERIVATIVES INTO THE ACTIVE SITE OF TUBULIN

The effect of 1,3-oxazole in the colchicine binding site (CBS) of β -tubulin is studied *in silico*, the molecular docking of 1,3-oxazole in the CBS of β -tubulin is performed, and the results of the analysis of ligand-receptor complexes are shown. An adequate model of the CBS of B-subunit of β -tubulin is created. The model is checked by the redocking of colchicine into the CBS, and the stable ligand-protein complex ($E_{bind} = -8$ kcal/mol, RMSD = 1.2042 Å) is obtained. The high cytotoxic activity of compounds **1**, **3**, and **4**, which form a stable ligand-protein complexes ($E_{bind} = -7.7$, -5.5 , -6.2 , -5.8 kcal/mol), is justified by the molecular docking. It is shown that these compounds bind to amino acid residues of CBS via hydrogen bonds and π - σ bonds, like colchicine. Compounds **1**, **3**, and **4** can be recommended for the further study as promising antimitotic agents.

Keywords: molecular docking, tubulin, colchicine, 1,3-oxazole derivatives.