

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 576.311.348.7

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТУБУЛИНОВОГО ДИМЕРА С ЦИТОСТАТИКАМИ

© 2012 г. Л. Р. Варжабетян¹, Д. В. Глазачев², К. Б. Назарян^{1, 2*}

¹Российско-Армянский (Славянский) университет, Ереван, 0051 Армения

²Институт молекулярной биологии Национальной академии наук, Ереван, 0014 Армения

Поступила в редакцию 20.06.2011 г.

Принята к печати 15.09.2011 г.

Колхицин, подофиллотоксин и индибулин – цитостатики природного происхождения, блокирующие полимеризацию тубулина, – используют при лечении новообразований. Однако сфера их применения ограничена из-за высокой токсичности и малой избирательности. Перспективно провести направленный дизайн препаратов, обладающих меньшей токсичностью и большей специфичностью, с экспериментами по компьютерному моделированию взаимодействия тубулина с указанными цитостатиками. С этой целью использовали программу для исследования макромолекул методами молекулярной динамики и механики CHARMM. В частности, применяли стратегию, по которой молекулы каждого изучаемого цитостатика располагали в нескольких различных случайных ориентациях вокруг предполагаемого сайта связывания на тубулине. В результате моделирования на молекуле тубулина идентифицированы участки взаимодействия с цитостатиками. Показано, что при взаимодействии в этих участках произошли структурные изменения, которые могут быть ответственны за полимеризацию тубулина. Таким образом, впервые обнаружены изменения в структуре тубулина в местах связывания цитостатиков, которые могут оказать существенное влияние на его функцию.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, тубулиновый димер, индибулин, колхицин, подофиллотоксин.

MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION OF THE TUBULIN DIMER WITH CYTOSTATICS, by L. R. Varzhabetyan¹, D. V. Glazachev², K. B. Nazaryan^{1, 2*} (¹Russian-Armenian (Slavonic) University, Yerevan, 0051 Armenia; ²Institute of Molecular Biology, Yerevan, 0014 Armenia; *e-mail: karen.nazaryan@gmail.com). Colchicin, podophyllotoxin and indibulin are natural cytostatics that are used in the treatment of neoplasms. But applications of those compounds are rather restricted due to the high toxicity and low specificity. It seems very promising to investigate possibility to design new analogs of the above mentioned drugs that will possess higher cytostatic activity and less toxicity. For this purpose we see computer modeling experiments of tubulin and above mentioned compounds interaction as a powerful approach to design new artificial cytostatics with desired properties. In the current study the CHARMM software of protein-ligand interaction molecular dynamics method has been used. Particularly the following strategy has been applied. Molecules of the cytostatics have been positioned at several random positions around binding sites of tubulin and after energy minimization several binding sites have been identified on the tubulin macromolecule. In these binding sites structural changes that may be responsible for tubulin polymerization have been detected.

Keywords: molecular dynamics simulation, tubulin dimer, indibulin, colchicine, podophyllotoxin.

Колхицин и родственные ему соединения, алкалоиды из *Барвинка* (винкристин, винбластин), таксаны (paclitaxel, docetaxel) – цитостатики, используемые при лечении новообразований. Хотя эти соединения эффективны, потенциал их действия ограничен высокой токсичностью и приобретенной к ним устойчивостью клеток [1]. Молекулярное моделирование используют как для изучения взаимодействий различных молекул белковой природы

[2, 3], так и для конструирования новых лекарственных веществ. Структуры практически всех новых лекарств, появившихся в последние годы, прошли через эту стадию, которая дает возможность отобрать молекулы, оптимальным образом связывающиеся с заданными мишенями [4].

Тубулин – основной белок микротрубочек, в них он находится в форме димера, состоящего из двух форм – α - и β -тубулина. Одна молекула α -тубулина и одна молекула β -тубулина в цитоплазме клеток объединяются в димер [5]. Этот белок –

* Эл. почта: karen.nazaryan@gmail.com

мишень для большинства антимитотических соединений. Например, воздействие колхицина, подофиллотоксина и индибулина приводит к ингибированию полимеризации микротрубочек в G₂/M фазах клеточного цикла [6].

Цель данного исследования – поиск соединений, обладающих антимитотическими свойствами и низкой нейротоксичностью. Задача работы – это компьютерное моделирование механизмов взаимодействия тубулинового димера с колхицином, подофиллотоксином и индибулином *in silico*.

При молекулярном моделировании динамики процессов взаимодействия использовали программу CHARMM [7, 8] и метод “неявной сольватации” (implicit solvation method) с функцией эффективной энергии (EEF1), использующей силовое поле CHARMM19 [9]. Этот метод позволяет сократить время моделирования, так как дает возможность удалить из моделируемой системы молекулы растворителя, а также все атомы водорода, которые образуют ковалентные связи с атомами углерода в исследуемых объектах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Структуры и основные параметры. Пространственная структура тубулина описана в банке белковых структур PDB [10] – файл 1TUB [11]. Чтобы получить структуры индибулина, колхицина и подофиллотоксина, создали профайлы, описывающие их с использованием метода “сравнительного моделирования” (Comparative modeling) [12]. Исходное расположение атомов в моделях данных структур было приблизительным, и для дальнейшей их коррекции произведена минимизация энергий структур алгоритмами Steep-Descent (SD) и Newton-Raphson (ABNR) [7].

Шаг моделирования равен 2 фс, т.е. после каждых двух фемтосекунд происходит перерасчет результирующих сил, действующих на все атомы моделируемой системы [13]. Длительность одного моделирования – 20 нс, так как уже к этому времени энергия взаимодействия соединений с тубулином колебалась в узком интервале. Длительность всего процесса молекулярного моделирования динамики составляла около 810 ч процессорного времени на кластере с шестнадцатью dual quad-core Xeon процессорами с операционной системой Linux.

Начальное расположение соединений около тубулина. Индибулин взаимодействует с α -субъединицей тубулинового димера, причем известно, что при ацетилованном Lys40 α -тубулина ингибирование полимеризации тубулина не происходит [14]. Поэтому для выяснения роли Lys40 получили две модели α -тубулина, с ацетилованным и неацетилованным Lys40. Индибулин располагали в 20 случайных ориентациях рядом с

Lys40 в каждой модели тубулина. Чтобы получить случайные расположения, использовали следующую стратегию: сначала индибулин переместили на расстояние 1000 Å от α -тубулина, затем его “прокручивали” вокруг осей X, Y, Z на $60n^\circ$ (n – случайное целое число, полученное от генератора случайных чисел) для всех 20 случаев в каждой модели α -тубулина. После этого индибулин сместили на расстояние 6–7 Å по вектору, соединяющему центр его массы с C _{α} -атомом Lys40.

Сайт связывания колхицина и подофиллотоксина на β -тубулине один и тот же [15–17]. Каждое из этих соединений располагали в 10 различных ориентациях вокруг него. Чтобы получить случайные расположения, использовали описанную ранее стратегию. Каждая моделируемая система состояла приблизительно из 4100 атомов.

Визуализацию молекулярных структур осуществляли с помощью программы Visual Molecular Dynamics (VMD 1.8.7) [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Молекулярное моделирование динамики взаимодействия β -тубулина с колхицином и подофиллотоксином

Молекулярное моделирование динамики взаимодействия колхицина с β -тубулином показало, что только в четырех положениях из десяти колхицин способен взаимодействовать с мишенью. Во всех случаях он связался с одними и теми же участками полипептидной цепи тубулина, включающими аминокислотные остатки Pro245–Val258 и Val349–Thr351 (рис. 1а). В случае с подофиллотоксином найдено пять таких положений; во всех случаях подофиллотоксин взаимодействовал с аминокислотными остатками Asn247–Leu254 и Val349–Cys354 (рис. 1б). На рис. 2 показана структура β -тубулина после связывания цитостатика, наложенная на структуру свободного β -тубулина. Как видно, после связывания цитостатика произошли конформационные изменения участков главной цепи Gly244–Arg262 и Val349–Ile356, в состав которых входила разрушенная α -спираль (Arg251–Pro259) и тяж (Lys350–Val353) β -листа соответственно. При анализе тубулинового димера [11] выявлены области на α - и β -тубулине, участвующие в димеризации субъединиц (рис. 3). На α -тубулине это области “А” (Gly220–Thr223), “Б” (Ala174–Glu183), “В” (Leu391–Gly412) и “Г” (Glu97–Arg105). Область “В” представляет из себя α -спираль, имеющую изгиб в 90° (Lys401–Phe404). На β -тубулине – области “1” (Ser324–Asn337), “2” (Gly345–Cys356), “3” (Pro245–Arg264), “4” (Pro162–Ile165) и “5” (Cys129–Gln133). В область “1” включена α -спираль (Ser324–Val335), область “2” имеет в составе крайний тяж β -листа (Lys350–Val353), в области

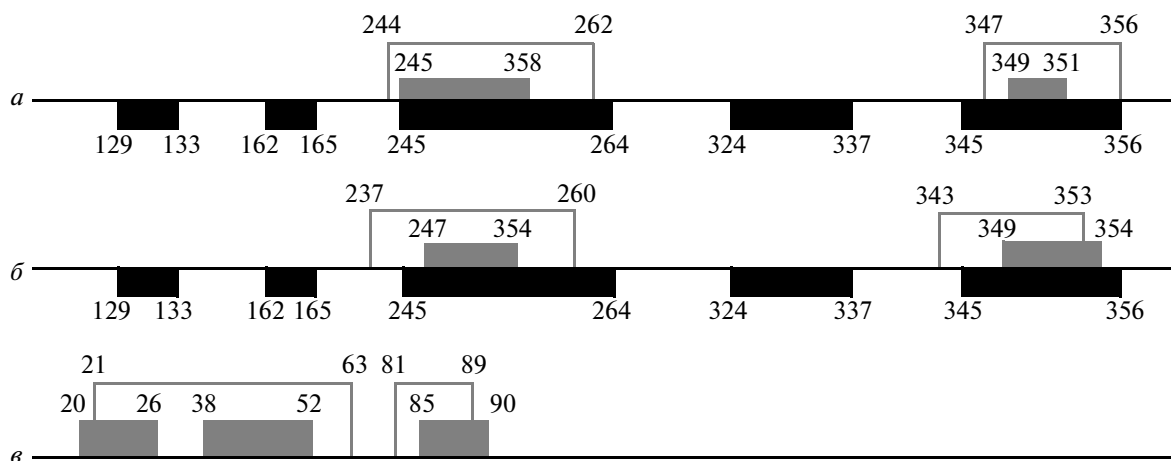


Рис. 1. Фрагменты аминокислотных последовательностей β -тубулина (*a*, *b*) и α -тубулина (*c*). Серыми прямоугольниками показаны участки главной цепи тубулинов, с которыми взаимодействовали колхицин (*a*), подофиллотоксин (*b*) и индибулин (*c*). Участки главной цепи β -тубулина, которые участвуют в полимеризации с α -тубулином, выделены черным. Белыми прямоугольниками отмечены участки главной цепи, смещенные относительно первоначального состояния после взаимодействия с цитостатиками.

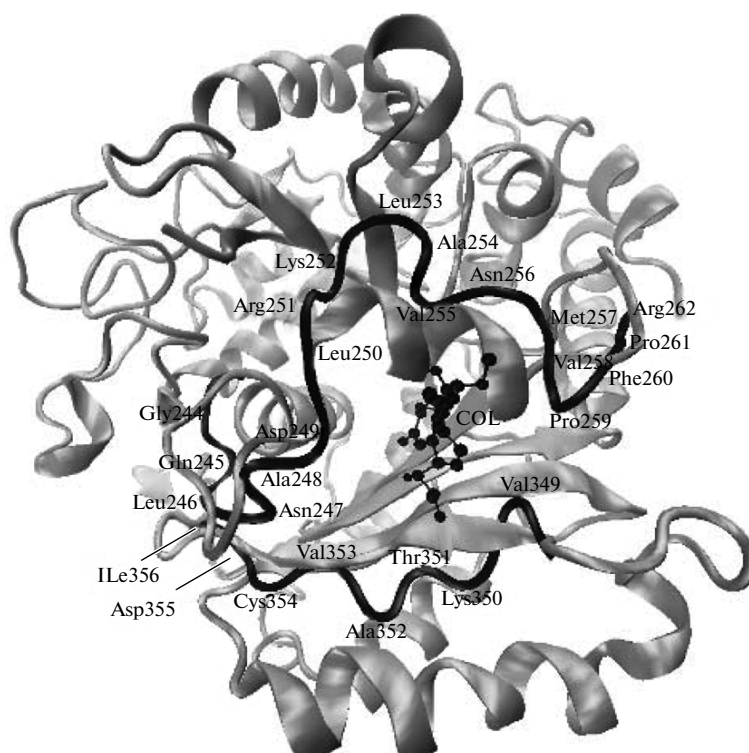


Рис. 2. Сопоставление пространственных структур свободного β -тубулина и β -тубулина в комплексе с колхицином. Участки, которые претерпели конформационные изменения после связывания с колхицином, выделены черным цветом.

“3” – α -спираль (Arg253–Val260). Сайт связывания колхицина и подофиллотоксина на β -тубулине – область между участками “2” и “3”, в свою очередь, “2” и “3” взаимодействуют с участками “Б”, “В” и “Г” на α -тубулине.

Усредненные значения энергий взаимодействия (сумма электростатической и ван-дер-вагльсовской энергии) β -тубулина с колхицином и подофиллотоксином показаны на рис. 4а. Средняя энергия взаимодействия β -тубулина с колхицином

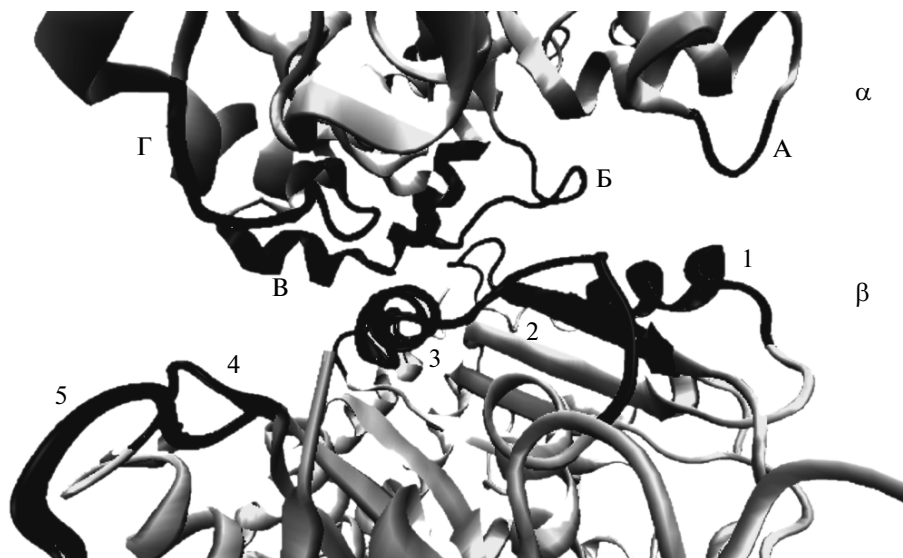


Рис. 3. Область димеризации тубулиновых субъединиц. Черным цветом отмечены участки субъединиц, взаимодействующих друг с другом.

и подофиллотоксином равна -13.14 ккал/моль и -28.52 ккал/моль соответственно.

Молекулярное моделирование динамики взаимодействия α -тубулина с индибулином

Результаты молекулярного моделирования динамики взаимодействия индибулина в 20 различных положениях с α -тубулином показали, что в 50% случаев при использовании тубулина с неацетилированным Lys40 индибулин связался с одними и теми же участками на тубулине: Cys20–Leu26, Ser38–Phe52, Gln85–Glu90.

В качестве примера рассмотрим 15-ю ориентацию индибулина, где он попал в своеобразный кармашек, образованный остатками аминокислот α -тубулина: Tyr24–Phe30, Ser38–Asp50, Lys60–Pro63, Leu86–His88 (рис. 5). На рис. 4в для этого варианта показаны колебания энергии взаимодействия индибулина с α -тубулином в течение 20 нс. Средняя энергия взаимодействия приблизительно равна -17.67 ккал/моль, и, как видно на рис. 4, начиная с 8–9 нс, колебания энергии малы, что свидетельствует о закреплении индибулина на этом участке. При этом кислород главной цепи Phe49 образовал водородную связь с “NH”-группой индибулина длиной 2.18 Å.

В случае использования тубулина с ацетилированным Lys40, индибулин взаимодействовал каждый раз с другим набором аминокислот α -тубулина, стабильный контакт между белком и лигандом отсутствовал, о чем свидетельствуют высокие

колебания усредненных энергий взаимодействия по всей траектории (рис. 4б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Места связывания колхицина и подофиллотоксина на β -тубулине, полученные в результате молекулярного моделирования, хорошо согласуются с экспериментальными данными [15–17]. Более того, наши исследования позволяют выявить конформационные изменения в структуре белка, возникающие при образовании комплекса. В результате связывания колхицина на β -тубулине произошло смещение фрагментов главной цепи Gly244–Arg262 и Asn347–Phe356 на 3–8 Å и на 2–4 Å соответственно и разрушилась структура α -спирали (Arg251–Pro259). В случае связывания подофиллотоксина на β -тубулине фрагмент главной цепи Thr237–Phe260 сместился на 3–10 Å, а фрагмент Lys343–Glu353 – на 3–7 Å. Анализ структуры тубулина позволяет предполагать, что эти фрагменты отвечают за связывание β - и α -тубулинов при образовании тубулинового димера.

В результате закрепления индибулина на α -тубулине с неацетилированным Lys40 произошло смещение фрагментов главной цепи Trp21–Pro63 и Gly81–Pro89 на 2–6 Å и на 2–4 Å соответственно. Возможно, эти участки отвечают за связывание друг с другом двух тубулиновых димеров, что приводит к нестабильному состоянию образовавшейся микротрубочки или же к неспособности к объединению димеров друг с другом. В случае с ацетилированным Lys40 α -тубулина взаимодействия индибулина с Lys40 не было, и индибулин

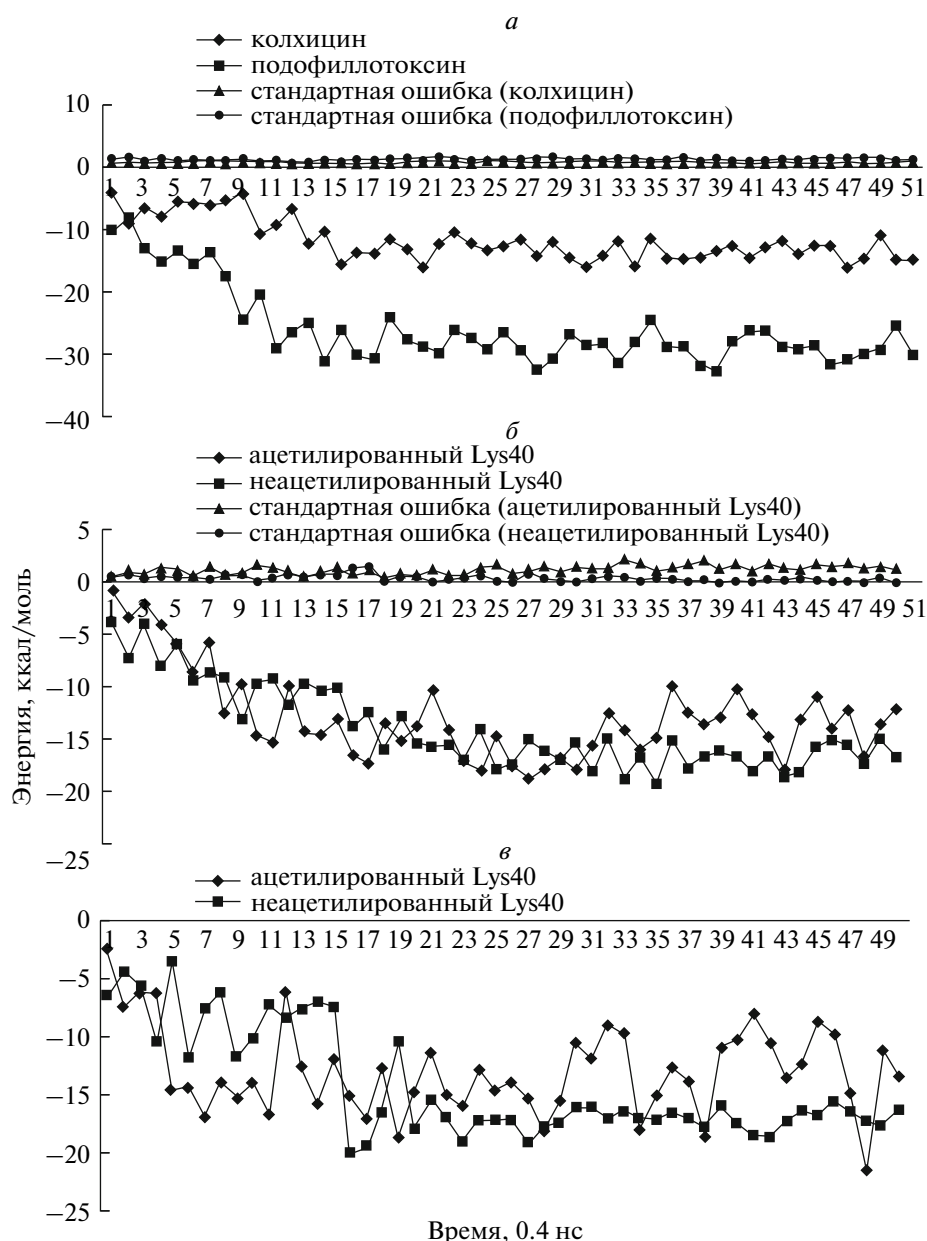


Рис. 4. Графики колебаний усредненных значений энергий для тех ориентаций, при которых наблюдали взаимодействие (связывание) колхицина и подофиллотоксина с β -тубулином (*a*) и аналогичные графики для взаимодействия (связывания) индибулина с неацелированным Lys40 α -тубулина (*б*). Там же приведены стандартные ошибки и усредненные значения энергий взаимодействия индибулина с ацелированным Lys40 α -тубулина. Графики колебаний энергий взаимодействия индибулина с двумя долями α -тубулина представлены в 15 ориентациях (*в*). На оси ординат показана сумма электростатической и ван-дер-ваальсовой энергий, на оси абсцисс — время (одно деление составляет 0.4 нс).

не приближался к центру связывания, находясь на поверхности белка. Возможно, это происходит потому, что при ацелировании лизин потерял свой положительный заряд.

Все три соединения, как показал компьютерный эксперимент, воздействуют на структуру тубулиновых субъединиц на тех участках, которые отвечают за образование микротрубочек, и изменение структуры тубулина влечет за собой ингиби-

рование полимеризации микротрубочек. Исследования, проводимые фармацевтической компанией “ZioPharm Oncology” на стадии доклинических *in vivo* испытаний и в начальной фазе I клинических испытаний, показали, что индибулин не обладал нейротоксичностью, что делает его потенциальным лекарственным препаратом для применения в терапии новообразований. Этого нельзя сказать о колхицине и подофиллотоксине,

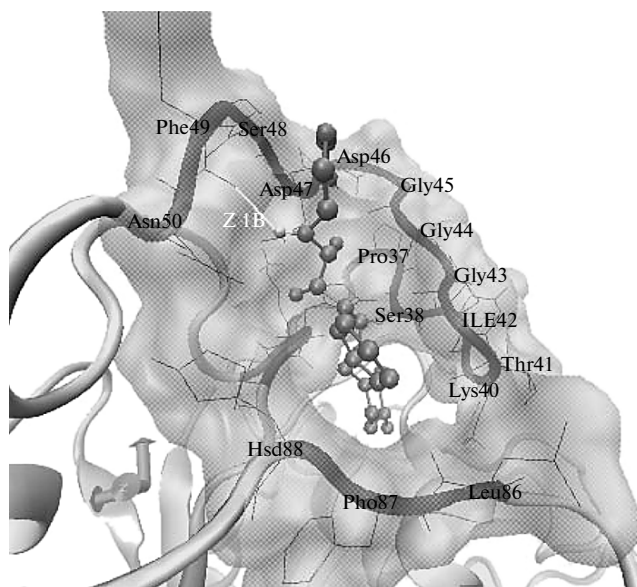


Рис. 5. Расположение индибулина после связывания с α -тубулином.

которые обладают нейротоксичными свойствами, что ограничивает использование их в высоких концентрациях [6].

Таким образом, в экспериментах *in silico* выявлены связывающие участки на тубулиновом димере для колхицина, подофиллотоксина и индибулина, что дает возможность в дальнейшем провести моделирование взаимодействия α - и β -субъединиц тубулина друг с другом с уже связанными на них цитостатиками и сравнить результаты с результатами моделирования того же взаимодействия α - и β -субъединиц тубулина, но без цитостатиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bacher G., Nickel B., Emig P., Vanhoefer U., Seeber S. 2001. D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity *in vivo*, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells and lacks neurotoxicity. *Cancer Res.* **61**, 392–399.
- Накобыан Д., Назарьян К. 2010. Molecular dynamics study of interaction and substrate channeling between neuron-specific enolase and B-type phosphoglycerate mutase. *Proteins: Struct. Func. Bioinform.* **78(7)**, 1691–1704.
- Накобыан Д., Назарьян К. 2006. Investigation of interaction between enolase and phosphoglycerate Mmtase using molecular dynamics simulation. *J. Biol. Struct. Dynamics.* **23(6)**, 625–634.
- Хельтье Д., Зиппл В., Роньян Д., Фолькерс Г. 2010. *Молекулярное моделирование*. М.: БИНОМ.
- Фултон А. 1987. *Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки*. М.: Мир.
- Brancale A., Silvestri R. 2007. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. *Med. Res. Rev.* **27(2)**, 209–238.
- Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States J.D., Swaminathan S., Karplus M. 1983. A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **4**, 187–217.
- Brooks B.R., Brooks C.L., Mackerell A.D., Nilsson L., Petrella R.J., Roux B., Won Y. 2009. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J. Comput. Chem.* **30**, 1545–1614.
- Lazaridis T., Karplus M. 1999. Effective energy function for proteins in solution. *Proteins.* **35**, 133–152.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. 2000. The protein data bank. *Nucl. Acids Res.* **28**, 235–242.
- Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. 1998. Tubulin alpha-beta dimer, electron diffraction. *Nature.* **393(6681)**, 191–195.
- Kolinski A., Gront D. 2007. Comparative modeling without implicit sequence alignments. *Bioinformatics.* **23(19)**, 2522–2527.
- Qun Ma, Jesús A. Izaguirre. 2003. *Proceedings of the ACM symposium on applied computing SAC 03*. N.Y., USA. 178–182.
- Wienecke A., Bacher G. 2009. Indibulin, a novel microtubule inhibitor, discriminates between mature neuronal and nonneuronal tubulin. *Cancer Res.* **69**, 171–177.
- Uppuluri Sh., Knipling L., Dan L. 1993. Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Biochemistry.* **90**, 11598–11602.
- Poliks B., Chiauzzi C., Ravindra R., Blanden A.R., Bane S. 2010. Characterization of the colchicine binding site on avian tubulin isotype β VI. *Biochemistry.* **49**, 2932–2942.
- Cortes F., Bhattacharyya B., Wolff J. 1977. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J. Biol. Chemistry.* **252**, 1134–1140.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38.