

ПРОЦИАНИДИН В3 – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЕПТИНА 9

© 2021 г. А.В. Вахрушева*, А.В. Кудрявцев*, О.С. Соколова*, **, К.В. Шайтан*. ***

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119234, Москва, ул. Ленинские горы, 1/12

**Биологический факультет Университета МГУ-ППИ в Шэньчжэнь,
517182, Провинция Гуандун, Шэньчжэнь, ул. Гоцзидасюеюань, 1, Китай

***Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4
E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 23.08.2021 г.

После доработки 23.08.2021 г.

Принята к публикации 31.08.2021 г.

Цитоскелетные белки септины участвуют во многих клеточных процессах, изменение их экспрессии является маркером онкологических заболеваний. В связи с этим септины могут являться потенциальной мишенью при воздействии на раковые клетки. Для поиска новых малых молекул, влияющих на структурную организацию септиновых филаментов, был проведен виртуальный скрининг библиотеки соединений базы данных PubChem и выбрано наиболее аффинное вещество из всех – флавоноид процианидин В3. С помощью молекулярного моделирования показано, что процианидин В3 взаимодействует с мономером септина SEPT9 в важной для связывания ГТФ области G1- и G4-мотивов и предотвращает димеризацию септиновых мономеров. Следовательно, процианидин В3 может рассматриваться как перспективное соединение для воздействия на структуру септиновых филаментов раковых клеток.

Ключевые слова: септин, конформационные изменения, SEPT9, процианидин В3, молекулярное моделирование, фармакофор.

DOI: 10.31857/S0006302921060016

Септины являются ГТФ-связывающими белками, структурно и эволюционно относящимися к суперсемейству Ras ГТФаз [1]. Впервые септины были обнаружены в почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* на месте разделения материнской и дочерней клеток [2, 3]. У млекопитающих известно 13 генов, кодирующих септины. На основе схожести последовательностей септины млекопитающих делятся на четыре группы (табл. 1) [4, 5].

Септины играют важную роль в процессах пролиферации и миграции клеток. Нокдаун SEPT2 и SEPT7 приводил к снижению инвазии раковых клеток и влиял на их механочувствительность [6], также происходило значительное снижение клеточной пролиферации, миграции и инвазии, увеличивался апоптоз [7]. В то же время повышенная экспрессия данных септинов приводила к увеличению миграционной подвижности, пролиферации и инвазии клеток, как пред-

полагается, через активацию сигнального пути MEK/ERK [7]. Аналогичные результаты были получены и для септина изоформы SEPT9 [8].

Во многих исследованиях показано, что септины значительно меняют свою экспрессию при разных типах онкологии [9]. При этом часть из них выступает в качестве супрессоров опухолевых процессов, а часть, наоборот, является онкогенной. При раке груди, яичников и поджелудочной железы наблюдается повышенная экспрессия SEPT2, SEPT7, SEPT9, что коррелирует с худшим прогнозом выживаемости [10]. Показано, что септины путем прямого взаимодействия с HER-2 могут таким образом увеличивать резистентность к онкологическим лекарственным препаратам, направленным на ингибирование протоонкогена, рецепторной тирозинкиназы HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2), кодируемую геном ErbB2 и высоко ассоциированную с прогрессией рака груди [11].

Базовые септиновые комплексы являются тетра-, гекса- или октамерами, из которых формируются высокоолигомерные структуры, такие как

Сокращения: GEF – фактор обмена гуанинового нуклеотида, СКО – среднеквадратичное отклонение.

Таблица 1. Классификация септинов млекопитающих

Группа септинов	Септины млекопитающих
SEPT2	SEPT1, SEPT2, SEPT4, SEPT5
SEPT6	SEPT6, SEPT8, SEPT10, SEPT11, SEPT14
SEPT7	SEPT7
SEPT3 (в некоторых источниках SEPT9)	SEPT3, SEPT9, SEPT12

филаменты, сетки и кольца [12, 13]. В организме человека септины собираются в гетеро-гексаком-плексы SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7 [14] и октамеры SEPT9-SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEPT6-SEPT7-SEPT9 (рис. 1) [15]; также филаменты могут формироваться на основе гексамерного комплекса SEPT2-SEPT6-SEPT7 [14]. Обычно септиновые комплексы формируются из представителей разных групп, в некоторых случаях септины из одной группы могут быть взаимозаменяемы (табл. 1).

Интересно отметить, что SEPT9 может не только участвовать в формировании филаментов, но и напрямую взаимодействовать с фактором обмена гуанинового нуклеотида (GEF). Показано, что SEPT9 через взаимодействие с GEF ингибирует Rho-сигналинг, играющий ключевую роль во многих клеточных процессах, включая реорганизацию цитоскелета [16, 17]. Также обнаружена колокализация GEF-SEPT9 с актиновым цитоскелетом [16]. Нарушение локализации септинов с актином и, как следствие, ремоделирование последнего, может приводить к апоптозу клеток [18, 19].

Формирование септиновых филаментов начинается с того, что две субъединицы септина гетеродимеризуются через два альтернативных интерфейса (G- и NC-) (рис. 1) путем конформационных изменений в ГТФ-связывающем кармане G-интерфейса [20]. Однако стоит отметить, что скорость гидролиза ГТФ у септинов очень низкая [21]. Более того, не все типы септинов имеют возможность гидролизовать ГТФ [20, 22]. Таким образом, предполагается, что связывание нуклеотидов важнее для формирования филаментной

структуры септинов, чем непосредственно их гидролиз [21, 23, 24].

В настоящее время активно исследуется только одно вещество, предположительно влияющее на структуру септинов – CPPU (N-(2-хлор-4-пиридил)-N'-фенилмочевина). Микромолярные концентрации этого соединения ингибировали пролиферацию, миграцию и инвазию человеческих раковых линий *in vitro* [25] и *in vivo* [26]. Эксперименты по молекулярному докингу показали преимущественное связывание CPPU с сайтом связывания ГТФ септина, что предположительно стабилизирует филаментную организацию септинов и препятствует дальнейшему связыванию и гидролизу ГТФ [27]. Модификация CPPU путем добавления атомов фтора и хлора UR214-1, UR214-7 и UR214-9 привела к ингибированию пролиферации клеточных линий рака яичников и рака эндометрия [28]. Однако CPPU имеет короткий период полувыведения, обладает цитотоксичностью, его применение вызывает небольшое системное воспаление [26]. Также было показано, что CPPU в низких концентрациях влияет на морфологию и функции митохондрий. В результате было предположено, что эффект CPPU относительно ингибирования пролиферации клеток не является специфичным [29].

В соответствии с этим поиск новых малых молекул, влияющих на структуру септинов и соответственно на миграционные и пролиферативные свойства клеток, является актуальной задачей. В данной работе методами молекулярного моделирования проанализированы различные конформационные состояния септина на примере SEPT9 и выбрана библиотека соединений базы

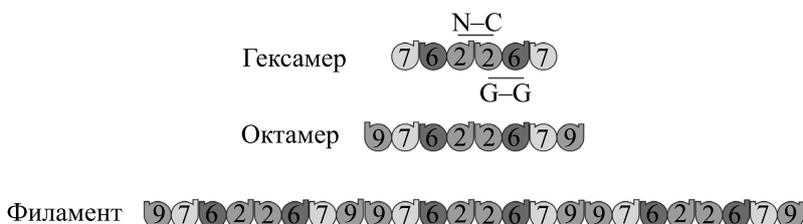


Рис. 1. Схематичное изображение организации септиновых гексамеров, октамеров и филаментов. Цифрами указаны номера септинов, N-C – N-C-интерфейс взаимодействия двух септиновых субъединиц, G-G – G-интерфейс взаимодействия двух септиновых субъединиц.

данных PubChem для проведения виртуального скрининга. В результате было выявлено соединение класса флавоноидов – процианидин В3, связывающееся предположительно с высокой аффинностью с септином SEPT9 в области присоединения ГТФ и препятствующее олигомеризации септиновых филаментов.

МЕТОДЫ

Подготовка белковых структур и лигандов. Подготовка белковых структур проводилась с помощью модуля Protein Preparation (Schrödinger, LLC, New York, США) [30] и включала удаление кристаллографической воды на расстоянии более 5 Å от белка, добавление полярных водородов и присвоение частичных зарядов Гастайгера. Силовое поле OPLS_2005 использовали для минимизации структур.

Для исследований методом виртуального скрининга использовали библиотеку PubChem. Для построения фармакофора использовали малую библиотеку FDA Pharm Classes, содержащую около 1 тысячи соединений, являющихся одобренными FDA лекарственными препаратами, прошедшими доклинические и клинические испытания. В связи с тем, что вещества были проверены относительно их безопасности, создание на их основе фармакофора и последующего скрининга библиотеки веществ обладало более высокой вероятностью отбора безопасного соединения, пригодного для применения на человеке. Также для сравнения и валидации результатов докинга в библиотеку были добавлены структуры, связывающиеся с септинами, – ГТФ, ГДФ, ГТФ-γ-S, CPPU и UR214-9. Для виртуального скрининга использовали большую библиотеку соединений, включающую в себя около миллиона субстанций из раздела «Органические соединения» базы данных PubChem [31].

Структуры лигандов подготавливали с использованием модуля LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, США). Лигандам приписывали частичные атомные заряды; несколько возможных состояний ионизации генерировали при pH 7.0 ± 2.0 для каждого соединения. Минимизацию энергии проводили для каждого лиганда до тех пор, пока она не достигала среднеквадратичного отклонения (СКО) в 0.01 Å.

Построение 3Д-фармакофора. 3Д-фармакофор для скрининга лигандов был построен на основе анализа лиганд-рецепторного комплекса белка SEPT9 с лигандами, отобранными после молекулярного докинга малой библиотеки FDA Pharm Classes в сайт связывания ГТФ и присоединения соседней септиновой субъединицы. Лиганды, имеющие значения Glide Score от -5 и ниже, использовали далее для построения фармакофора.

Их перечень включал следующие препараты: ¹⁵³SM оксабифор, миглитол, лодоксамид, иопромид, микофеноловая кислота, допамин, занамивир. Данные лиганды предварительно выравняли для нахождения общих функциональных групп. Построение фармакофора проводили в модуле Phase (Schrödinger, LLC, New York, США) [32]. Для генерации фармакофора соединения были подготовлены со следующими параметрами: до 10 конформационных состояний на одну вращающуюся связь и до 50 конформаций всего. Каждый лиганд был представлен минимум одной конформацией.

Комбинированный виртуальный скрининг на основе фармакофорного скрининга и молекулярного докинга. Для скрининга соединений использовали модули Glide и Phase (Schrödinger, LLC, New York, США) [32, 33]. 3Д-фармакофорный скрининг большой библиотеки соединений проводили по созданной ранее модели фармакофора. Оценку пригодности лигандов в данном случае проводили исходя из СКО и направлений векторов отклонения атомов лиганда от фармакофора, описывающих отличия 3Д-структуры лиганда при наложении на фармакофор. Из приблизительно одного миллиона соединений через данный скрининг было отобрано 25108 веществ, которые затем подготавливали с помощью LigPrep (Schrödinger, LLC, New York, США) по описанной выше процедуре подготовке лигандов для молекулярного докинга.

Пространственная ячейка для докинга имела размеры $20 \times 20 \times 20$ Å с центром относительно ключевых аминокислотных участков, находящихся в активном центре белка. Молекулярный докинг проводили в три стадии: HTVS (high-throughput virtual screening), SP (standard precision) и XP (extra precision). Результаты оценивали с помощью встроенных в пакет Schrödinger оценочных функций: Glide Score, Glide Emodel, а также по свободной энергии связывания, вычисленной по обобщенному методу Борна (MM-GBSA).

Glide Score и Glide Emodel являются эмпирическими оценочными функциями, аппроксимирующими свободную энергию связывания лиганда. Более отрицательные значения по данным параметрам отображают более сильное связывание.

Для сравнения оценочных функций в данной работе использовали оценку свободной энергии Гиббса $DE_{MM/GBSA}$, вычисленную с использованием обобщенного метода Борна (MM/GBSA) для учета эффекта сольватации на основании учета площади поверхности структуры, контактирующей с растворителем [34]:

$$\Delta E_{MM/GBSA} = E^{комп} - E^{рец} - E^{лиг},$$

$$\Delta E_{MM/GBSA} = E_{MM} + E_{GB} + \gamma A_{SA},$$

где $E^{\text{комп}}$ — полная энергия $E_{\text{ММ/GBSA}}$ комплекса «лиганд–рецептор», $E^{\text{рец}}$ — полная энергия $E_{\text{ММ/GBSA}}$ рецептора, $E^{\text{лиг}}$ — полная энергия $E_{\text{ММ/GBSA}}$ лиганда, $E_{\text{ММ}}$ — молекулярно-механическая энергия, включающая в себя все механические, электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия; E_{GB} — обобщенная энергия Борна, учитывающая влияние растворителя на свободную энергию молекулы; γA_{SA} — вклад в свободную энергию, пропорциональный площади поверхности молекулы A_{SA} .

Соединения с наилучшими показателями по Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA отбирали для последующих исследований.

Молекулярная динамика. Молекулярную динамику проводили с помощью программного пакета Desmond (Schrodinger, LLC, New York, США) [35]. Для этого структуру помещали в ячейку с размерами 1.5 нм в длину; использовали модель явного растворителя — SPC. Далее следовала минимизация методом наискорейшего спуска в силовом поле OPLS3e. Для релаксации использовали стандартный протокол, входящий в состав программного пакета Desmond и подходящий, по информации разработчика, для большинства стандартных систем. Данный протокол включал в себя две стадии минимизации (с фиксированными и нефиксированными тяжелыми атомами), за которыми следовало четыре стадии молекулярной динамики с последовательно уменьшающимися ограничениями. Применение данного протокола апробировано для подготовки сайта связывания белковых молекул и анализа лиганд-рецепторных взаимодействий.

Молекулярную динамику проводили при постоянной температуре (300 K) и давлении с использованием термостата Нозе-Хувера и баростата Паринелло-Рамана соответственно. Времена расчета молекулярно-динамических траекторий указаны отдельно в тексте.

Для оценки траекторий проведенной молекулярной динамики использовали параметры среднеквадратичного отклонения и среднеквадратичной флуктуации, также были проанализированы различные виды лиганд-белковых взаимодействий с помощью модуля Desmond — Simulation Interactions Diagram [35].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие ГТФазного домена септина с аналогом ГТФ. На первом этапе для характеристики сайта и взаимодействий лиганд-рецептор проводили молекулярную динамику димера ГТФазных доменов септина SEPT9 (PDB ID 5CYP) с нерасщепляемым аналогом ГТФ

(ГТФ- γ -S). Выбор целевой молекулы основывался на том, что SEPT9 является замыкающим фрагментом октамерной септиновой единицы и соединяет соседние октамеры в филаменты [15], а также имеет треониновый остаток, необходимый для гидролиза ГТФ [5]. Этот вариант септина еще не исследовался на предмет влияния на него малых молекул, в том числе и единственного известного ингибитора септинов — CPPU.

Была проведена предварительная минимизация кристаллической структуры SEPT9 (PDB ID 5CYP) со связанным аналогом ГТФ- γ -S. Через 3 нс система «лиганд–рецептор» была уравновешена, так как СКО не превышало 2.4 Å (рис. 2а). При анализе полученных данных были выявлены аминокислотные остатки белка SEPT9: Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Lys170, Asp172, которые в основном участвуют в образовании водородных связей; Ser37, Thr64, Asp87 — в образовании ионных связей; Arg241 — единственного гидрофобного взаимодействия; Ile61, His145, Glu178 — в образовании водных мостиков. В этой связи следует отметить аминокислотный остаток His145, который образовывал стабилизирующую связь через водный мостик в димере септинов между одной субъединицей и ГТФ, закрепленным в сайте связывания второй субъединицы (рис. 2б,в). Аминокислотные остатки Lys36, Ser37, Thr38, Arg60, Thr64 на протяжении всего времени моделирования постоянно контактировали с лигандом ГТФ- γ -S.

Так как целью работы был поиск малых молекул, нарушающих олигомеризацию септиновых филаментов, наша задача состояла в том, чтобы предотвратить проникновение ГТФ в сайт связывания SEPT9. Нуклеозидтрифосфаты, связываясь, участвуют в полимеризации и стабилизируют филаментную структуру септинов. Помимо этого, важно было также обеспечить, чтобы новый лиганд не связывал и не стабилизировал две субъединицы димерного SEPT9 друг с другом. Соответственно, для дальнейшего виртуального скрининга была выбрана мономерная структура SEPT9 в конформации без ГТФ и предварительно промоделированная в течение 50 нс (данные не приведены). Отобранные впоследствии лиганды также затем проверяли на димерной структуре.

Комбинированный скрининг библиотеки малых молекул. Для построения фармакофора была выбрана малая библиотека FDA Pharm Classes из базы PubChem, содержащая ориентировочно 1000 соединений. Пространственная ячейка размером 20 × 20 × 20 Å, по которой проводили докинг, была центрирована по координатам –6.943, 14.994, –0.952 (X, Y, Z) и ориентирована на место связывания фосфатной группы ГТФ, а также на область присоединения второй септиновой субъединицы, включая место стабилизирующей связи

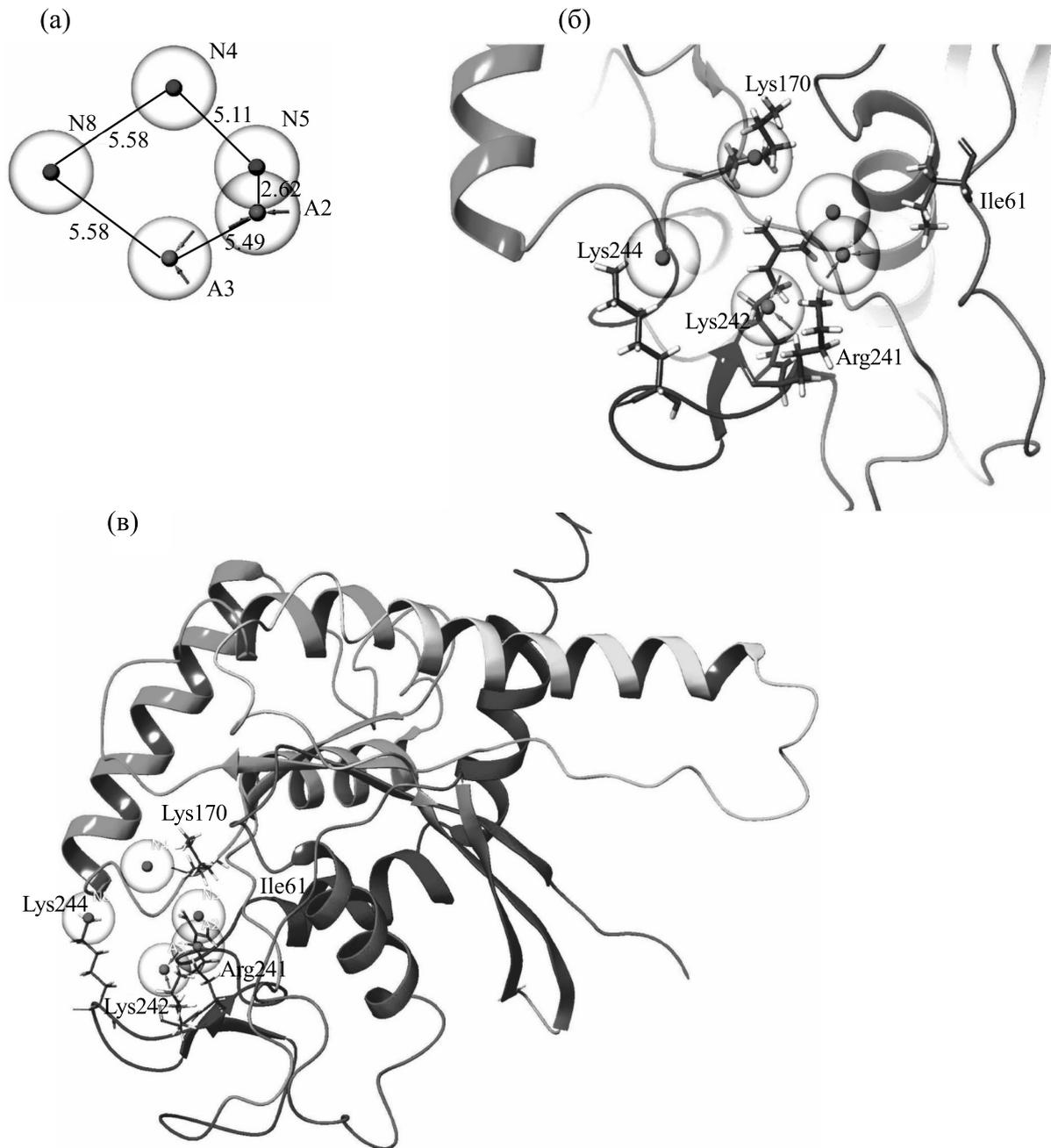


Рис. 3. (а) – Фармакофор (А – акцепторная группа, N – отрицательно-ионный тип группы), числами указано расстояние (в Å) между функциональными группами фармакофора; (б) – фармакофор в активном сайте белка SEPT9, выделены ключевые аминокислотные остатки; (в) – общий вид положения фармакофора относительно белка SEPT9.

Соединения после скрининга были ранжированы согласно параметрам Glide Score, Glide Emodel и MM-GBSA. Вещества, связавшиеся с наибольшей аффинностью, перечислены в табл. 2. Их потенциальную биологическую антинеопластическую (противоопухолевую) активность оценивали с помощью веб-сервиса PASC-Sonline [36].

Отобранные соединения были протестированы также с помощью других программ для молекулярного докинга, таких как AutoDock Vina [37], DockThor [38], SwissDock [39] и CB-Dock [40]. Наибольшую аффинность к септину по результатам всех тестов, как и ожидалось, показали ГТФ и его производные, а также вещества процианидин В3 и микофеноловая кислота; наименьшая аф-

Таблица 2. Характеристики соединений с наибольшей аффинностью к септину

№	Номер соединения	Название вещества	Glide Score	ММ-GBSA, ккал/моль	Glide Emodel	ММ-GBSA, ккал/моль	Предсказанная биологическая активность
1	135398633	ГТФ	-8.313	-31.27	-63.713	-37.52	Не определена
2	135398675	ГТФ-γ-S	-8.25	-29.53	-63.542	-31.2	Не определена
3	135398619	ГДФ	-8.824	-33.67	-63.366	-33.49	Не определена
4	126941	Метотрексат	-3.694	-27.25	-36.609	-21.27	0.319
5	6918837	Панобиностат	-5.03	-28.22	-56.272	-30.78	0.44
6	44564	Лодоксамид	-6.813	-28.72	-59.331	-37.52	0.351
7	446541	Микофеноловая кислота	-7.94	-31.53	-54.785	-31.53	0.463
8	53465279	Лезинурад	-7.263	-30.86	-47.539	-30.86	Не определена
9	73417413	Метокарбамол	-4.31	-26.49	-40.735	-25.17	Не определена
10	93379	CPPU	-2.175	-20.36	-30.396	-19.02	0.263
11	–	UR214-9	-2.341	-25.44	-37.638	-23.44	0.194
12	146798	Процианидин В3	-9.339	-30.64	-70.429	-35.64	0.582

финность была выявлена у CPPU и его аналога UR214-9 (данные не приведены).

Для валидации аффинных соединений была выбрана оценочная функция Glide Emodel, так как она имела наилучшую корреляцию с ММ-GBSA ($R^2 = 92\%$, $p = 0.001$). В итоге для дальнейших исследований было выбрано вещество процианидин В3, которое показало наибольшую аф-

финность при связывании с мономерной формой SEPT9 (рис. 4).

Второе найденное вещество с высокой аффинностью – микофеноловая кислота – не препятствовало формированию димерной формы септина и было исключено из дальнейших исследований.

Процианидин В3 с высокой аффинностью связывается с мономерной формой септина в области присоединения второй субъединицы и консервативного сайта для посадки ГТФ – G1- и G4-мотивов, контактирующих с фосфатными группами и гуаниновым основанием нуклеотида соответственно и важных для связывания ГТФ. Процианидины принадлежат к проантоцианидинам класса флавоноидов, встречающихся в яблоках, какао, винограде и ягодах [41].

Для идентификации образуемых взаимодействий между мономером SEPT9 и процианидином В3 проводили молекулярную динамику. Через 3 нс комплекс достигал равновесного состояния и отклонение белка составило не более 1.5 Å, а лиганда – не более 1 Å (рис. 5a). Образующие связи между процианидином В3 и SEPT9 перечислены в табл. 3. Дополнительно были выделены водные мостики, образованные аминокислотными остатками Gly33, Arg241, Lys244. Помимо этого сама структура мономера в комплексе с процианидином В3 стала более стабильной, в частности, регионы аминокислотных остатков 100–120, 180–210, по сравнению с димерной формой септина в комплексе с ГТФ-

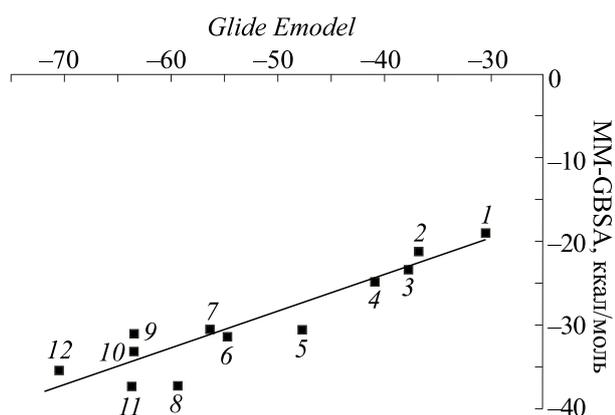


Рис. 4. Оценочная функция Glide Emodel относительно значений свободной энергии ММ-GBSA малых молекул: CPPU (1), метотрексат (2), UR214-9 (3), метокарбамол (4), лезинурад (5), микофеноловая кислота (6), панобиностат (7), лодоксамид (8), ГТФ-γ-S (9), ГДФ (10), ГТФ (11), процианидин В3 (12); $p = 0.001$.

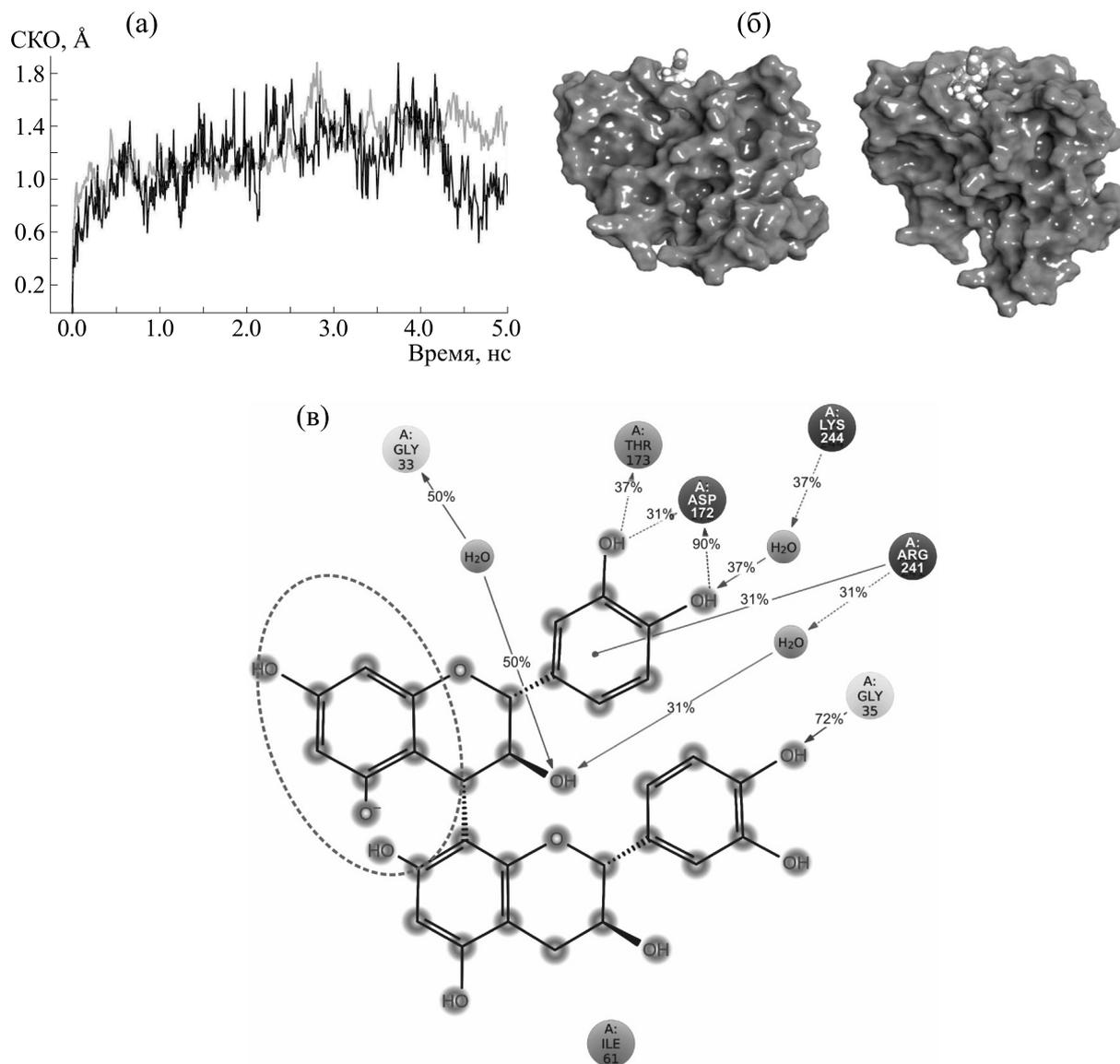


Рис. 5. (а) – СКФ в зависимости от времени: серая кривая – $\text{C}\alpha$ атомы мономерного белка SEPT9 относительно референсного фрейма, черная кривая – лиганд относительно SEPT9; (б) – общий вид в двух проекциях структуры мономерной формы SEPT9 с процианидином В3; (в) – схема контактов, образуемых процианидином В3 с аминокислотными остатками SEPT9; пунктирной линией выделена часть молекулы, стерически препятствующая стабилизации димерной формы SEPT9.

γ -S, где среднеквадратичные флуктуации достигали 2.5–3.0 Å, по сравнению с 1.5–2.0 Å в случае комплекса мономерного септина с процианидином В3. При этом вторичная структура белка не нарушилась. Учитывая, что значение ΔG (свободной энергии Гиббса), рассчитанное методом ММ-GBSA, для данного комплекса составило около –35 ккал/моль (–147 кДж/моль) в начальной позиции и –52 ккал/моль (–209 кДж/моль) после молекулярной динамики, то можно предполагать высокую стабильность данного лиганд-рецепторного комплекса.

По результатам анализа формируемых взаимодействий процианидина В3 с мономерной формой SEPT9 было обнаружено следующее расположение лиганда (рис. 5б,в): одна из групп процианидина В3 – пирокатехин – связывалась с Gly35 из G1 мотива SEPT9, таким образом занимая место присоединения фосфатных групп ГТФ. При этом бензопирановая часть процианидина В3 фиксировалась со стороны боковой петли через гидрофобные взаимодействия с Ile61 и частично через водородные связи с аминокислотой Arg60, как и в случае комплекса SEPT9 со связан-

Таблица 3. Связи между процианидином В3 и мономерной формой SEPT9

№	Атом со стороны белка SEPT9	Атом со стороны процианидина В3	Тип связи (Å)
1	Gly35(NH)	O12	Водородная (2.31)
2	Arg241(HH22)	Ароматическая группа (C3–C16)	Пи-катионное взаимодействие (4.7)
3	Lys244(NZ)	Ароматическая группа (C13–C27)	Пи-катионное взаимодействие (5.7)
4	Asp172(OD2)	H21	Водородная (1.72)
5	Thr173(HG1)	O10	Водородная (1.96)
6	Thr173(OG1)	H20	Водородная (1.88)
7	Arg60(HH21)	O4	Водородная (2.04)
8	Arg60(HH22)	O6	Водородная (1.99)
9	Arg60(NH2)	O7	Солевой мостик (4.8)
10	Ile61(O)	H22	Водородная (2.47)

ной структурой ГТФ- γ -S. Таким образом, часть процианидина В3 занимала и блокировала место связывания фосфатных групп ГТФ. Более того, вторая часть процианидина В3 формировала связи с регионом связывания гуанинового основания – G4, а именно с аминокислотными остатками Asp172, Thr173. В результате процианидин В3 полностью задействовал основные консервативные регионы структуры SEPT9, фиксируя положения аминокислотных остатков, участвующих в связывании ГТФ, в пре-конформации, т.е. до связывания ГТФ. Помимо этого, процианидин В3 имел два дополнительных пи-катионных взаимодействия, что обеспечивало дополнительную аффинность связывания (см. табл. 3). Стоит отметить, что процианидин В3 располагается в сайте связывания SEPT9 таким образом, что одна из его ароматических групп оказывается развернута в сторону, стерически препятствуя присоединению другой септиновой субъединицы. Докинг процианидина В3 в сайт взаимодействия одной септиновой субъединицы со второй не приводил к высоко аффинному связыванию процианидина В3 в сайте второй субъединицы, в том числе не формировалась стабилизирующая связь с аминокислотным остатком His145, участвующая в образовании димерной молекулы SEPT9 в случае связывания ГТФ или его аналогов. Также при моделировании димерной структуры септинов с процианидином В3 связывание лиганда не происходило, что подтверждает неспособность процианидина В3 стабилизировать димерную форму SEPT9.

В литературе влияние проантоцианидинов на пролиферацию рассматривалось относительно широкого спектра раковых клеток. Например,

антипролиферативный эффект был зафиксирован для клеток рака легкого A427, рака груди MCF-7, желудочной аденокарциномы CRL-1739 [42] и других типов рака. При этом механизм действия проантоцианидинов остается не до конца исследованным. Показано, что в большинстве случаев запускаются процессы апоптоза в раковых клетках [43]. В работе [44] был предложен механизм ингибирования процианидином В3 гистоновой ацетилтрансферазы, в работе [45] – механизм снижения процианидином В2 активности ДНК метилтрансфераз или [46] через связывание с фактором NF- κ B. Тем не менее пока не были проведены структурные исследования взаимодействий процианидина В3. Стоит отметить, что влияние процианидинов на септины пока не исследовалось. Как отмечалось выше, экспрессия септинов и механизмы их действия изменяются по-разному в зависимости от типа онкологии. В частности, экспрессия SEPT9 повышена при раке груди, яичников [8, 47]. При лейкемии наблюдается другой механизм, а именно образование химерных белков септинов с геном MLL (Mixed Lineage Leukemia) путем хромосомных транслокаций. В связи с этим предполагается разный эффект веществ, влияющих на септины, относительно клеточных процессов, происходящих в раковых клетках различного генеза.

Таким образом, в данной работе был проведен виртуальный скрининг соединений, нарушающих димеризацию септинов SEPT9 и найдено вещество из группы флавоноидов – процианидин В3. Данный флавоноид связывается с септином SEPT9 предположительно с высокой аффинностью в важной для связывания ГТФ области G1-и G4-мотивов, контактирующих с фосфатными

группами и гуаниновым основанием нуклеотида, что, вероятно, может предотвращать димеризацию септиновых мономеров. Для того чтобы подтвердить селективное влияние процианидина ВЗ на пролиферативную способность раковых клеток, необходимо в дальнейшем провести дополнительные исследования по изучению влияния процианидина ВЗ на структуру септинов и механизмы пролиферации в раковых клетках.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-34-90178.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [48].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. D. Leipe, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and L. Aravind, *J. Mol. Biol.* **317** (1), 41 (2002).
2. L. Hartwell, *Exp. Cell Res.* **69** (2), 265 (1971).
3. B. Byers and L. Goetsch, *J. Cell Biol.* **69** (3), 717 (1976).
4. C. Martínez, M. A. Sanjuan, J. A. Dent, et al., *Biochem. J.* **382** (3), 783 (2004).
5. E. T. Spiliotis, *J. Cell Sci.* **131** (1), 207555 (2018).
6. F. Calvo, R. Ranftl, S. Hooper, et al., *Cell Reports* **13** (12), 2699 (2015).
7. N. Zhang, L. Liu, N. Fan, et al., *Oncotarget* **7** (38), 61587 (2016).
8. M. E. Gonzalez, E. A. Peterson, L. M. Privette, et al., *Cancer Res.* **67** (18), 8554 (2007).
9. D. Connolly, I. Abdesselam, P. Verdier-Pinard, and C. Montagna, *Biol. Chem.* **392** (8–9), 725 (2011).
10. R. K. Singh, K. K. Kim, N. Khazan, et al., *BioRxiv* **2020**, 954529 (2020).
11. E. A. Marcus, E. Tokhtaeva, S. Turdikulova, et al., *Biochem. J.* **473** (12), 1703 (2016).
12. A. A. Rodal, L. Kozubowski, B. L. Goode, et al., *Mol. Biol. Cell* **16** (1), 372 (2005).
13. M. Kinoshita, C. M. Field, M. L. Coughlin, et al., *Developmental Cell* **3** (6), 791 (2002).
14. M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, F. Hauer, et al., *Nature* **449** (7160), 311 (2007).
15. M. S. Kim, C. D. Froese, M. P. Estey, and W. S. Trimble, *J. Cell Biol.* **195** (5), 815 (2011).
16. K.-I. Nagata and M. Inagaki, *Oncogene* **24** (1), 65 (2004).
17. Y. Zeng, Y. Cao, L. Liu, et al., *Cell Death & Disease* **10**, 720 (2019).
18. C. Poüs, L. Klipfel, and A. Baillet, *Front. Cell Devel. Biol.* **4**, 126 (2016).
19. M. Desouza, P. W. Gunning, and J. R. Stehn, *BioArchitecture* **2** (3), 75 (2012).
20. M. Sirajuddin, M. Farkasovsky, E. Zent, and A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106** (39), 16592 (2009).
21. E. Zent and A. Wittinghofer, *Biol. Chem.* **395** (2), 169 (2014).
22. A. M. Vrabioiu, S. A. Gerber, S. P. Gygi, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (4), 3111 (2004).
23. M. Farkasovsky, P. Herter, B. Voss, and A. Wittinghofer, *Biol. Chem.* **386** (7) (2005).
24. M. Mendoza, A. A. Hyman, and M. Glotzer, *Curr. Biol.* **12** (21), 1858 (2002).
25. D. Vardi-Okinin, M. Golan, and N. J. Mabeesh, *PLoS One* **8** (8), e73179 (2013).
26. W. Blum, T. Henzi, L. Pecze, et al., *Oncotarget* **10** (65), 6944 (2019).
27. D. Angelis, E. P. Karasmanis, X. Bai, and E. T. Spiliotis, *PLoS One* **9** (5), e96390 (2014).
28. K. K. Kim, R. K. Singh, N. Khazan, et al., *Sci. Rep.* **10** (1) (2020).
29. L. R. Heasley, G. Garcia, and M. A. McMurray, *Eukaryotic Cell* **13** (11), 1411 (2014).
30. G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, et al., *J. Computer-Aided Mol. Design* **27** (3), 221 (2013).
31. S. Kim, J. Chen, T. Cheng, et al., *Nucl. Acids Res.* **49** (D1), D1388 (2021).
32. S. L. Dixon, A. M. Smondyrev, and S. N. Rao, *Chem. Biol. Drug Design* **67** (5), 370 (2006).
33. R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, et al., *J. Med. Chem.* **49** (21), 6177 (2006).
34. D. A. Case, T. E. Cheatham 3rd, T. Darden, et al., *J. Comput. Chem.* **26** (16), 1668 (2005).
35. K. J. Bowers, D. E. Chow, H. Xu, et al., in *Proc. 2006 ACM/IEEE Conf. on Supercomputing (SC'06)* (2006), p. 84.
36. D. A. Filimonov, A. A. Lagunin, T. A. Glorizova, et al., *Chem. Heterocyclic Compounds* **50** (3), 444 (2014).
37. O. Trott and A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* (2009).
38. I. A. Guedes, A. M. S. Barreto, D. Marinho, et al., *Sci. Rep.* **11**, 3198 (2021).
39. A. Grosdidier, V. Zoete, and O. Michielin, *Nucl. Acids Res.* **39**, W270 (2011).
40. Y. Liu, M. Grimm, W. Dai, et al., *Acta Pharmacol. Sinica* **41** (1), 138 (2019).
41. Y. Lee, *Toxicol. Res.* **33** (4), 273 (2017).

42. X. Ye, R. L. Krohn, W. Liu, et al., *Mol. Cell Biochem.* **196** (1–2), 99 (1999).
43. U. Lewandowska, K. Szewczyk, K. Owczarek, et al., *Nutrition and Cancer* **65** (8), 1219 (2013).
44. K.-C. Choi, S. Park, B. J. Lim, et al., *Biochem. J.* **433** (1), 235 (2011).
45. A. Shilpi, S. Parbin, D. Sengupta, et al., *Chemico-Biological Interactions* **233**, 122 (2015).
46. G. G. Mackenzie, A. M. Adamo, N. P. Decker, and P. I. Oteizaet, *Biochem. Pharmacol.* **75** (7), 1461 (2008).
47. J. F. Burrows, S. Chanduloy, M. A. McIlhatton, et al., *J. Pathology* **201** (4), 581 (2003).
48. V. V. Voevodin, A. S. Antonov, D. A. Nikitenko, et al., *Supercomput. Front. Innovations* **6** (2), 4 (2019).

Procyanidin B3 as a Potential Inhibitor of Human Septin 9

A.V. Vakhrusheva*, **A.V. Kudryavtsev***, **O.S. Sokolova***, ******, and **K.V. Shaitan ***, *******

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

***Faculty of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, International University Park Road 1, Guangdong Province, Shenzhen 517182, Chinese People's Republic*

****Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

Septin cytoskeletal proteins are involved in many cellular processes; changes in gene expression are a hallmark of cancer. In this context, septins emerge as a potential target for cancer cells. In search of new small molecules that may affect the organization of septin filaments in the cellular structures, a virtual screening of the PubChem database compound library was performed and procyanidin B3, a flavonoid lipid molecule, with better affinity than other substances, was selected. Molecular modeling showed that procyanidin B3 can interact with the septin monomer SEPT9 in the region of the G1 and G4 motifs important for GTP binding and prevent dimerization of septin monomers. Therefore, procyanidin B3 could be considered to be a promising compound to affect the structure of septin filaments in cancer cells.

Keywords: septin, conformational changes, SEPT9, procyanidin B3, molecular modeling, pharmacophore