

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики доцент, к.б.н. Нипорко Олексій Юрійович
Протокол № ____ засідання
кафедри від “ ____ ” _____
_____ 2022 р.

**Дослідження впливу авермектинів на протеїнази MEK1, PI3K,
PIKK, RAK1, що впливають на структуру та динаміку цитоскелету**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 091 Біологія
ОП «Біологія (високі технології)»
Бондаря Кирила Максимовича

Науковий керівник від кафедри доцент
кафедри молекулярної біотехнології та
біоінформатики к.б.н. **Самофалова Дарія
Олексіївна**

Робота виконана під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та
молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової
біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Оцінка захисту роботи

Зміст

АНОТАЦІЯ	3
ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	5
1.1. Загальна характеристика авермектинів	5
1.2. Загальна характеристика авермектин-інгібувальних сигнальних шляхів	6
1.2.1. MAPK-шлях	6
1.2.2. АКТ-mTOR	7
1.2.3. PAK1	9
1.2.4. Wnt/Beta-Catenin/Tcf	10
1.3. Вплив авермектинів на сигнальні шляхи.....	11
1.3.1. Вплив авермектинів на ERK	11
1.3.2. Вплив авермектинів на PTEN-PI3K-ERK	12
1.3.3. Вплив авермектинів на PAK1	13
1.3.4. Вплив на Wnt/Beta-Catenin/Tcf	13
1.4. Вплив авермектинів на цитоскелет	14
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	15
2.2. Дослідження просторової структури цільових білків з використанням бази даних Protein Data Bank.....	15
2.3. Аналіз білок-лігандних та білок-білкових взаємодій.....	16
2.4. Підготовка структур лігандів та білків	16
2.5. Молекулярний докінг	16
РОЗДІЛ 3	18
3.1. Результати аналізу амінокислотних послідовностей цільових білків	18
3.2. Результати дослідження наявності просторової структури цільових білків з використанням бази даних Protein Data Bank.....	19
3.3. Результати аналізу білок-лігандних та білок-білкових взаємодій на поверхні цільових білків.....	21
3.4. Результати підготовки структур для подальшого молекулярного докінгу	22
3.5. Результати докінгу	25
ВИСНОВКИ.....	35
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	36
ДОДАТКИ.....	42

АНОТАЦІЯ

Бондар К.М. Дослідження впливу авермектинів на протеїнкінази MEK1, PI3K, PKK, PAK1, що впливають на структуру та динаміку цитоскелету. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У роботі проведено аналіз структури та функцій протеїнкіназ MEK1, PI3K, PKK, PAK1, проаналізовано структури та фізико-хімічні властивості авермектинів, що на них впливають, відібрано та встановлено просторові структури цільових білків, проведена їх оптимізація та відновлення, досліджені їх білок-білкові та білок-лігандні взаємодії. Відібрані авермектини для докінгу, сформовано їх просторові структури, стереоізомери та таутомери, проведено їх оптимізацію. Побудовано карту сайту зв'язування, проведено молекулярний докінг та проаналізовано утворені комплекси.

При підтвердженні результатів, авермектин бути застосований для розробки більш потужних і селективних інгібіторів протеїнкіназ, які можна використовувати як ліки при терапії раку.

Ключові слова: протеїнкінази, авермектин, молекулярний докінг

ВСТУП

Протеїнкінази MEK1, PI3K, PIKK, PAK1 беруть участь у регуляції формування цитоскелету, його стійкості до полімеризації та деполімеризації, факторів адгезії, тощо. Додатковою функцією, але не менш важливішою є їх участь у передачі сигналів в складі сигнальних каскадів. Саме на цьому базується терапія проти раку підшлункової залози, недрібноклітинного раку легень, які є одними з найагресивніших видів раку і низькою виживаністю.

Представлені кінази модулюють багато сигнальних шляхів, порушена регуляція яких сприяє канцерогенезу та є критичним регулятором росту ракових клітин. Таким чином, їх цільове пригнічення є новою потенційною терапевтичною стратегією раку. Отже,

Об'єктом дослідження є клас сполук авермектинів.

Основна мета роботи полягає у дослідженні особливостей взаємодії авермектинів з протеїнкіназами MEK1, PI3K, PIKK, PAK1, та встановлення просторових структур їх комплексів.

Відповідно до мети були поставлені наступні **завдання** до виконання бакалаврської кваліфікаційної дипломної роботи:

- Провести порівняння гомологів протеїнкіназ, що належать до різних царств.
- Встановити просторову та доменні структури протеїнкіназ та їх експериментально встановлені сайти взаємодії з іншими молекулами.
- Виконати пошук авермектинів, що мають вплив на цільові білки, виконати їх підготовку до докінгу.
- Встановити особливості взаємодії авермектинів з цільовими білками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика авермектинів

Авермектини – це комплекс з восьми близькоспоріднених компонентів, що зустрічаються в природі як продукт ферментації актиноміцетів *Streptomyces avermitilis*, що були виділені у 1978 році в Інституті Кітасато із зразка ґрунту, зібраного в Кавана, місто Іто, префектура Сідзуока, Японія. Пізніше того ж року виділений актиноміцет був відправлений до дослідницьких лабораторій Merck Sharp і Dohme для тестування. Різні ретельно контрольовані бульйони ферментували з використанням виділеного актиноміцету. Ранні тести показали, що деякі з цілих ферментованих бульйонів були активні проти *Nematospiroides dubius* у мишей у принаймні восьмикратному діапазоні без помітної токсичності. Після цього антигельмінтики було виділено та ідентифіковано як сімейство близькоспоріднених сполук. З'єднання були остаточно охарактеризовані, а нові види, які їх синтезували, були описані командою з Merck у 1978 році та названі *Streptomyces avermitilis* [1].

Вісім різних структур, включаючи івермектин, абамектин, дорамектин, еприномектин, моксидектин і селамектин, були виділені та розділені на чотири основні компоненти (A1a, A2a, B1a і B2a) і чотири другорядні компоненти (A1b, A2b, B1b і B2b). У біологічному відношенні найактивнішими є авермектини групи B1, зокрема B1a – івермектин, лактон якого гідрогенізований у положеннях C22 - C23.

За структурою кожен компонент комплексу авермектину - макролід з 16-членного макроциклічного лактону, що зв'язаний з діолеандрозою. Лактонна частина складається з п'яти молекул пропіонату і семи молекул

ацетату, та 2-метилбутирату (А-група авермектинів) або ізобутирату (В-група авермектинів).

Авермектини застосовуються як пестициди для знешкодження шкідників і паразитичних червів через їх антигельмінтні та інсектицидні властивості. Крім того, вони володіють протипухлинною, протидіабетичною, протівірусною, протигрибковою дією і використовуються для лікування ряду метаболічних розладів. Авермектини діють шляхом запобігання передачі електричного імпульсу в м'язах і нервах безхребетних, посилюючи вплив глутамату на специфічний для безхребетних хлорний канал.

1.2. Загальна характеристика авермектин-інгібувальних сигнальних шляхів

1.2.1. MAPK-шлях

Родина мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK) утворює три різні каскади, які опосередковують клітинні реакції на різноманітні подразники, включаючи фактори росту, хімічний або осмотичний стрес, опромінення, бактеріальну інфекцію та прозапальні цитокіни: кінази, що регулюються позаклітинним сигналом (ERK) [2], амінотермінальні кінази c-Jun (JNK) або стрес-активовувані протеїнкінази, і p38 MAPK [3]. Класичні MAPK (ERK1 і ERK2) активуються різноманітними стимулами росту і диференціювання клітин і відіграють центральну роль у мітогенній передачі сигналів [4]. Каскади p38 та JNK в основному активуються різними факторами стресу навколишнього середовища. Більшість MAPK активуються шляхом подвійного фосфорилування мотиву Thr-Хаа-Tyr кіназами MAPK або МКК. МКК, у свою чергу, активуються кіназами МКК (МККК), понад 30 з яких описано. Однак деталі того, як вони активуються, або який МККК активує певний МКК *in vivo*, досі недосконало вивчені. Каскади MAPK часто

функціонують як мультипротеїнові комплекси, в яких різні компоненти збираються на каркасному білку та/або за допомогою специфічних білок-білок докінг-сайтів, тим самим збільшуючи швидкість і специфічність каскаду. Майже всі MAPK фосфорилують свої субстрати на залишках серину або треоніну, але їх специфічність *in vivo* ще більше посилюється наявністю різних місць докінгу, які полегшують взаємодію з субстратами [5].

MAPK є еволюційно консервативними та відіграють ключову роль у перетворенні позаклітинних сигналів у внутрішньоклітинні відповіді. У ссавців було ідентифіковано 14 генів MAP-кінази, які визначають 7 різних шляхів MAP-кінази. Вони контролюють велику кількість фундаментальних клітинних процесів, а саме: ріст, проліферацію, диференціювання, рух, стресову реакцію, механізми виживання та апоптоз [6].

Каскад ERK1/2 є першим вивченим шляхом MAPK і сприймається як прототип інших кіназних каскадів. Він відіграє центральну роль передачі сигналів від широкого спектра позаклітинних агентів, які діють через різні рецептори. Найчастіше активація таких рецепторів передається декількома механізмами на ГТФазу Ras на плазматичній мембрані. У свою чергу, активований Ras рекрутує компоненти MAP3K каскаду (Raf-1, B-Raf, Rafs) на плазматичну мембрану, чим спричиняє їх активацію. Після стимуляції ERK1/2, а також компонентів MAPKAPK, фосфорилуються сотні субстратів, відповідальних переважно за проліферацію та диференціювання, а також морфологію та пластичність нейронів, контроль стресової відповіді та регуляцію апоптозу [7].

1.2.2. АКТ-mTOR

Сигнальний шлях АКТ-mTOR жорстко регулюється диференціальним фосфорилуванням ключових білків. АКТ — це серин/треонін (Ser/Thr) кіназа, яка модулює сигнали від факторів росту, нейромедіаторів і цитокінів,

а також регулює ріст, проліферацію, виживання, диференціацію та метаболізм клітин. Вона вимагає фосфорилування за двома ключовими залишками для повної активації, Ser 473 і Thr 308 [8]. mTOR також є Ser/Thr кіназою, яка є центральною для двох структурно та функціонально різних комплексів, комплексу mTOR I та mTOR II. АКТ функціонально взаємопов'язана з обома комплексами mTOR.

Сигнальний шлях АКТ-mTOR бере участь у процесах клітинного циклу та сприяє виникненню та розвитку пухлин. Передача сигналів АКТ-mTOR регулює синтез білка та цитоскелет актину, що є критичним для функціонування організму.

Багато низхідних молекул формують сигнальний шлях АКТ-mTOR, активований АКТ безпосередньо фосфорилує і активує mTOR. Далі mTOR сприяє зв'язуванню цикліну D1 з циклінзалежною кіназою (CDK), щоб ініціювати поділ клітини. Високі рівні експресії цикліну D1 можуть викликати перехід клітинного циклу з фази G1 на фазу S, скоротити клітинний цикл і прискорити розвиток раку. P27kip1 належить до сімейства білків інгібіторів CDK і негативно регулює клітинний цикл; він пригнічує активність CDK, що призводить до зупинки клітинного циклу та блокування проліферації клітин. АКТ пригнічує блокаду клітинного циклу шляхом фосфорилування P27kip1 і прискорює проліферацію та диференціацію клітин [9]. Крім того, mTOR допомагає регулювати синтез біологічних макромолекул, таких як білки, нуклеотиди та ліпіди, забезпечуючи, таким чином, матеріали, необхідні для росту ракових клітин [10].

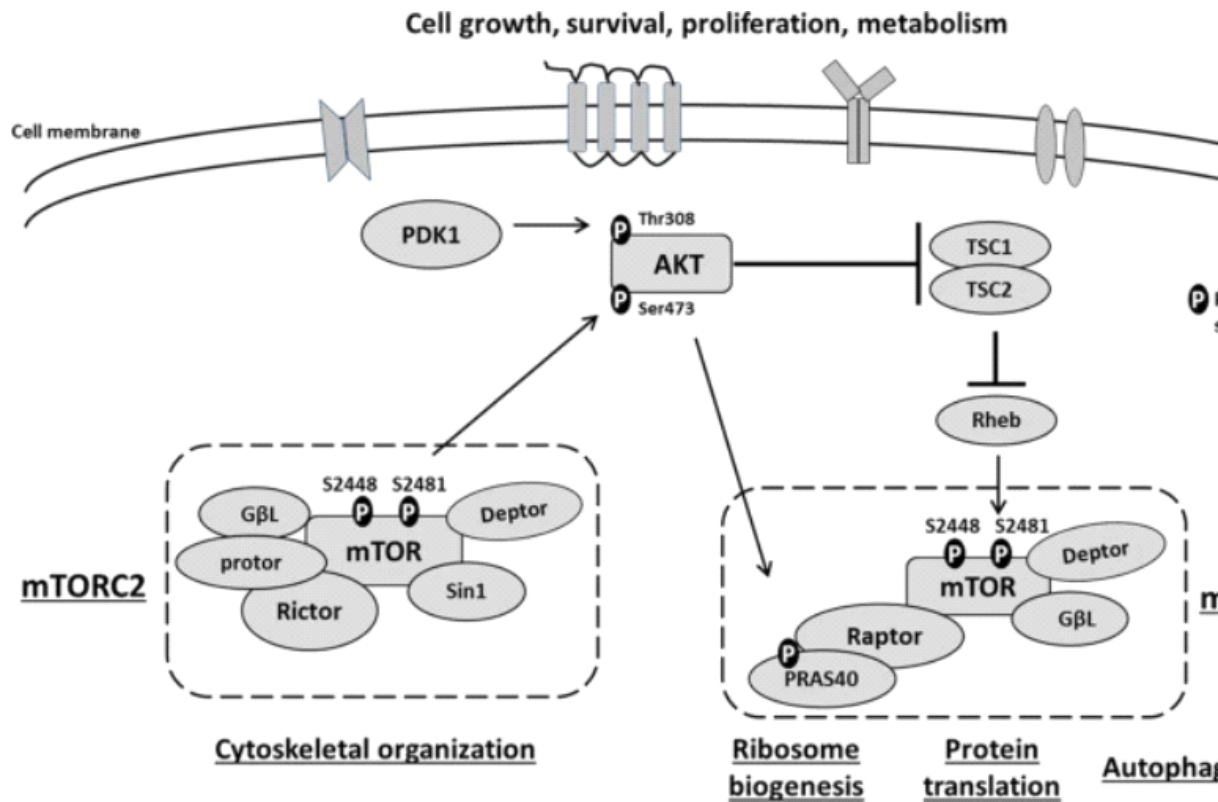


Рис 1.1. – Структура АКТ-*mTOR* сигнального каскаду

1.2.3. *PAK1*

Серин/треонін-протеїнкіназа *PAK1* - ензим, який у людини кодується геном *PAK1* і є одним із шести членів сімейства *PAK* серин/треонінових кіназ, які поділяються на дві групи. *PAK1* регулює ремоделювання цитоскелету, фенотипічну передачу сигналів та експресію генів та впливає на широкий спектр клітинних процесів, таких як спрямована рухливість, інвазія, метастазування, зростання, розвиток клітинного циклу, ангіогенез. *PAK* білки включають в себе *PAK1*, *PAK2*, *PAK3* і *PAK4*. Ці білки є мішенями для малих GTP-зв'язувальних білків *Cdc42* і *Rac* і беруть участь у широкому діапазоні біологічних активностей. На біохімічному рівні ці активності регулюються здатністю *PAK1* фосфорилувати субстрати, що взаємодіють з

ефектором, що, у свою чергу, запускає каскад біохімічних подій, що кумулюються в клітинну фенотипову відповідь. Приклади клітинних процесів, регульованих РАК1, включають динаміку актину і волокон мікротрубочок, критичні етапи розвитку клітинного циклу. Білки РАК необхідні реорганізації цитоскелета і передачі ядерних сигналів, РАК1 бере участь у генезі пухлини, тоді як інгібування сигналів РАК1 викликає апоптоз пухлинних клітин.

1.2.4. Wnt/Beta-Catenin/Tcf

З тих пір, як у 1982 році було ідентифіковано першого члена сімейства Wnt1, дослідження передачі сигналів Wnt постійно зростали. Сигнальний шлях Wnt/ β -катеніну необхідний для ембріонального розвитку та регенерації тканин дорослої людини.

Канонічний шлях Wnt в основному контролює проліферацію клітин, тоді як неканонічні шляхи Wnt регулюють полярність і міграцію клітин, а два основних шляхи утворюють мережу взаємної регуляції. Передача сигналів Wnt відіграє важливу роль у самовідновленні деяких тканин у ссавців. Наприклад, сигнальний шлях Wnt пов'язаний з розвитком і оновленням епітеліальної тканини тонкої кишки і сприяє диференціації клітин Панета. Крім того, сигнальний шлях Wnt тісно пов'язаний з метаболізмом і регенерацією печінки, відновленням і метаболізмом легеневої тканини, оновленням волосяних фолікулів, розвитком системи кровотворення, дозріванням і активністю остеобластів [11,12].

Шлях Wnt/ β -катеніну включає чотири сегменти: позаклітинний сигнальний, мембранний сегмент, цитоплазматичний сегмент і ядерний сегмент. Позаклітинні сигнали в основному опосередковуються білками Wnt, включаючи Wnt3a, Wnt1 і Wnt5a. Сегмент клітинної мембрани в основному містить рецептори Wnt Frizzled (специфічний білок Frizzled семикратного

трансмембранного рецептора) і LRP5/6. Цитоплазматичний сегмент в основному включає β -катенін, DVL, глікогенсинтазу кіназу-3 β (GSK-3 β), AXIN, APC і казеїнкіназу I (CK1). Ядерний сегмент в основному включає β -катенін, який транслокується в ядро, членів сімейства TCF/LEF, а також низхідні гени-мішені β -катеніну, такі як MMP і c-Myc [13].

Канонічний шлях Wnt зазвичай високо консервативний і активований через зв'язування позаклітинних лігандів Wnt з мембранними рецепторами за допомогою аутокринних/паракринних методів. Після активації типовий шлях Wnt індукує стабільність β -катеніну та переносить його в ядро, в кінцевому підсумку полегшуючи експресію генів, що беруть участь у проліферації, виживанні, диференціації та міграції клітин [14].

1.3 Вплив авермектинів на сигнальні шляхи

1.3.1. Вплив авермектинів на ERK

Шлях ERK є важливим із шляхів MAPK, що регулює численні події, такі як ріст клітин, виживання та смерть. Інгібування шляху ERK призведе до загибелі клітин або пригнічення росту і виживання клітин. У шляху ERK центральний фосфо-ERK1/2 відіграє центральну роль. 48-годинна обробка авермектином призводить до значного зниження фосфо-ERK1/2 в клітинах SH-SY5Y. Проте зниження висхідних білків, ERK, RAS, c-RAF, phosph-c-RAF, phosphMEK1/2 не відбувається. Фосфо-ERK був першим білком на вісі шляху Ras/Raf/MEK/ERK, на який вплинуло застосування авермектину. Фосфорилування ERK регулюється MEK1/2. Таким чином, MEK1/2 є цільовим білком авермектину. У клітинних лініях, PC12 і SK-N-SH, авермектин також пригнічував активацію (фосфорилування) ERK, що призвело до зменшення кількості білків фосфо-MSK1, фосфо-p90Rsk, фосфо-Elk1/2. ФохО3а, Vcl-2 також є двома білками, які регулюються шляхом ERK

та їх кількість також була зменшена авермектином [15].

1.3.2. Вплив авермектинів на PTEN-PI3K-ERK

Біоінформаційний аналіз, проведений у дослідженні з нейтрофілами коропа, показав, що MBD2 може індукувати деметилування острівців CpG в області промотора фосфатази та гомолога тензину, делетованого на десятій хромосомі (PTEN), який є одним із ключових регуляторів функції клітини та імунної відповіді [16]. PTEN негативно регулює експресію PI3K і призводить до зниження експресії АКТ [17]. Крім того, сигнальний шлях PI3K/АКТ/Raf/MEK/ERK бере участь у формуванні NET.

Більшість досліджень показали, що для вивільнення NET необхідний респіраторний спалах і залучення внутрішньоклітинного сигнального шляху протоонкогенної серин/треонін-кінази (Raf)/мітоген-активованої протеїнкінази (MEK)/позаклітинної сигнально-регульованої кінази (ERK). [7]. Окрім цього, шлях фосфоінозитид-3-кінази (PI3K)/треонінкінази (АКТ) бере участь у формуванні NET у відповідь на іммобілізовані імунні комплекси [18]. Інгібування PI3K знижує регуляцію як АКТ, так і передачі сигналів Raf/MEK/ERK [19]. Крім того, активація PI3K, АКТ та їх нисхідна регуляція ERK була важливою для ініціювання вивільнення реактивних форм кисню (ROS)-залежних NET [20].

При оцінці зміни рівня мРНК та експресії білка індикаторів шляху PI3K-ERK у восьми групах нейтрофілів коропа, мРНК рівні PI3K, Akt, MEK та ERK у нейтрофілів, які піддалися впливу авермектину, були значно знижені порівняно з контролем, тоді як рівень білка ERK збільшився приблизно в 1,9 рази. Це вказує на те, що авермектин негативно регулює активацію шляху PI3K-ERK. Інгібування PI3K значно зменшувало регуляцію Akt та шляху Raf/MEK/ERK [19].

1.3.3. Вплив авермектинів на PAK1

Івермектин сприяє поліубіквітуванню кінази PAK1, яка бере участь у деградації протеасоми, яка потім може інгібувати шлях Akt/mTOR. Повідомлялося, що івермектин порушує взаємодію PAK1, (який є білком, що зв'язує АКТ і сприяє фосфорилуванню та активації АКТ) з АКТ, що призводить до її інактивації [20].

1.3.4. Вплив на Wnt/Beta-Catenin/Tcf

Авермектин V1a пригнічує передачу сигналів Wnt/ β -катеніну, зв'язуючись з TELO2, що важливо для підтримки та функцій PIKK. TELO2 був ідентифікований як білок, що зв'язується з авермектином V1a, разом із білковими партнерами TTI1 та TTI2 [21]. С-термінальна α -спіраль TELO2 відігравала незамінну роль у зв'язуванні авермектину V1a *in vitro*. У *Caenorhabditis elegans* авермектин зв'язується з трансмембранним доменом глутамат-керованого хлоридного каналу (GluCl), що складається з п'яти гомологічних субодиниць, кожна з яких містить чотири α -спіральні трансмембранні проміжки. Авермектин глибоко проникає в інтерфейс між двома субодиницями і утворює контакт із упакованими α -спіралями [22]. Аналогічно, TELO2 має спіральні повтори, в яких сусідні спіралі упаковані в суперспіральну структуру, α -соленоїд [21]. С-термінальний соленоїд TELO2 демонструє значну структурну подібність з білками, які мають спіральну структуру, такими як IPO, субодиниця білкової фосфатази 2A (PP2A), гомолог куліна 1 та білки, що зв'язують мікротрубочки. Зниження TELO2 опосередковує авермектин-індуковану супресію передачі сигналів Wnt/ β -

катеніну. Нокдаун TELO2 зменшив рівні β -катеніну та β -катенін/TCF-залежну активацію транскрипції.

TELO2 є важливим кофактором для PI3K, таких як mTOR, ATM, ATR і DNA-ПК [21,23]. Тривале застосування авермектину знижувало рівні білка PI3K. Зокрема, mTOR був запропонований як перетин між сигнальними шляхами Wnt/ β -катенін і PI3K/АКТ. Справді, АТФ-конкурентні інгібітори mTOR кінази, PP242 [24] і Torin2 (це дослідження), пригнічували β -катенін/TCF-залежну активацію транскрипції і рівні білка β -катеніну, відповідно. Авермектин знижував рівні фосфорилування АКТ і кінази S6, що узгоджувалося з результатами застосування авермектину або нокдауну TELO2 [25].

1.4. Вплив авермектинів на цитоскелет

Івермектин знижує рівень білка β -катеніну та TELO2, який є важливим кофактором PI3K. Взаємодія між івермектином і тубуліном, показала, що івермектин покращує ступінь полімеризації тубуліну у ссавців. Абамактин і дорамектин можуть пригнічувати експресію P-гр. Знижена експресія P-гр може зменшити стабілізацію мРНК тубуліну та актину. При обробленні клітин HeLa івермектин стабілізує тубулін проти ефектів деполімеризації і запобігає поділу клітин *in vitro*. Це говорить про те, що івермектин зв'язується з мікротрубочками та стабілізує їх. Таким чином, івермектин впливає на динаміку полімеризації та деполімеризації тубуліна, що може призвести до загибелі клітин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Пошук за гомологією амінокислотних послідовностей цільових білків

Послідовності амінокислот протеїнкіназ MEK1 (Q02750), PAK1 (Q13153), PTEN (P60484), бета-катеніну (Q9NSA3) людини і протеїнкіназ MEK1 (Q94A06), PTEN (Q9LT75), бета-катеніну (O22161) *Arabidopsis thaliana* були завантажені з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>) і використані як вихідні дані для веб-сервера Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для пошуку ортологів білків [26,27] і для RCSB PDB (www.rcsb.org) для пошуку та аналізу інформації щодо сайтів зв'язування, доменну структуру, їх фізичні величини [28].

2.2. Дослідження просторової структури цільових білків з використанням бази даних Protein Data Bank

Пошук просторових структур відбувався за допомогою онлайн-інструменту RCSB PDB Advanced Search (<https://www.rcsb.org/search/advanced>) з вихідними даними, якими є послідовності амінокислот протеїнкіназ і бета-катеніну людини та *Arabidopsis thaliana*, що було імпортовано з бази даних UniProtKB. Відповідно, встановлені просторові структури білків було проаналізовано за параметрами роздільної здатності, E-Value та ідентичності відносно повного сиквенсу.

2.3. Аналіз білок-лігандних та білок-білкових взаємодій

Аналіз білок-лігандних та білок-білкових взаємодій проводився за допомогою сервісу RCSB PDB та STRING (<https://string-db.org/>) на основі структурної гомології.

2.4. Підготовка структур лігандів та білків

Відомі структури авермектинів були завантажені з бази даних хімічних структур PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) в якості вихідних даних для докінгу. Ці структури було проаналізовано за такими параметрами: молекулярна маса, площа полярної поверхні, кількість важких атомів, кількість донорів та акцепторів водневого зв'язку. Ці дані дають змогу оцінити ефективність ліганду та спорідненість при білок-лігандній взаємодії [29,30]. Файли структур було отримано у .csv форматі, який згодом було конвертовано у формат .smi і, в подальшому, в .sdf за допомогою OpenBabel.

Для підготовки лігандів використовувався плагін Ligprep – Schrodinger ligand preparation product для створення високоякісних тривимірних атомних структур. Підготовка ліганду включала 2D–3D перетворення, генерування варіацій, корекцію, та оптимізацію структур.

2.5. Молекулярний докінг

Карта сайту була створена за допомогою Receptor grid generation у плагіну Glide (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) Maestro (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”). Після створення сітки рецептора ліганди прикріплюються до білка за

допомогою протоколу докінгу Grid based Ligand Docking with Energetics. Ліганди були прикріплені за допомогою “Standart precision mode” (SP).

Докінг було проведено в програмі Schrödinger (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”) [31] з використанням плагіну Glide. Доковані конформери було оцінено за допомогою Glide (G) Score за параметрами docking score, glide gscore та glide emodel. Зображення ліганд-білкових взаємодій отриманих комплексів було проаналізовано за допомогою плагіна Ligand interaction diagram.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати аналізу амінокислотних послідовностей цільових білків

В результаті аналізу амінокислотних послідовностей було визначено такі характеристики: межі функціональних доменів, які необхідні для визначення підходящої структури, що несе каталітичну функцію; розмір послідовності, для визначення повноти структури; визначено сайти зв'язування АТФ, інгібіторів для подальшого докування. Сайти зв'язування було позначено на амінокислотних послідовностях досліджуваних білків у **Додатку 1**

Таблиця 3.1 - Результати аналізу амінокислотних послідовностей.

Назва	Розмір	Маса	Сайти	Домени	Ортологи
МЕК1	393	43,439	97 - АТФ , U0126, інгібітор 194 - К-252a , інгібітор 208 - АТФ	68 – 361 протеїн кіназа	Рослини - ідентичність до 48,97% Гриби - до 50%
РАК1	545	60,647	299 - АТФ	270–521 - протеїн кіназа 75-88 – CRIB	Рослини - ідентичність до 66% Гриби - до 70%
PTEN	403	47.166	PO₄ - 43, 73-75, 308 TLA - 92-93, 124-131, 171	14-185 - Тензин- фосфатаза 190-305 - C2- тензин	Рослини - ідентичність до 52.81% Гриби - до 47.92%
Бета-катенін	781	85,497	J8V, J8Y, J97 - 35-37 R9Q - 205-206, 208, 211, 242-243, 245-248, 253	Повтори ARM	Рослини - ідентичність до 52.51% Гриби - до 27.60% Бактерії - до 100%

Дослідження ортологів протеїнкіназ МЕК1 показало, що МЕК1 має спорідненість з гомологами рослин, що досягає 48,97%, та грибів - до 50%. Протеїнкіназа РАК1 споріднена має ідентичність до РАК1 рослин - 66%,

грибів - до 70%. Спорідненість структури PTEN до гомологів у рослин максимум до 52,81%, до гомологів у грибів - максимум до 47.92%. Виходячи з цього, можна сказати, що вищенаведені протеїнкінази та їх гомологи є консервативними.

Ортологи бета-катеніну консервативні по відношенню до рослин (ідентичність досягає 52.51%) та грибів (до 27.60%), але споріднена до гомологів бактерій з ідентичністю, що досягає 100%.

3.2. Результати дослідження наявності просторової структури цільових білків з використанням бази даних Protein Data Bank

За допомогою інструменту RCSB PDB Advanced Search було встановлено кількість встановлених експериментальних структур для поданих протеїнкіназ: MEK1 – 61, з яких 48 мають повноатомну структуру; PAK – 27, PTEN – 8, бета-катенін – 22, для кожних з трьох протеїнкіназ всі встановлені структури є повноатомні.

Для MEK1 було досліджено 20 структур і обрано дві з найбільшим показником ідентичності, найменшим E-Value та оптимальною роздільною здатністю:

3ZLY: Entity 1 – структура MEK1 з інгібітором, що найкраще репрезентує протеїнкіназу, ідентичність якої складає 99%, має E-Value 1,811e-227. Структуру було встановлено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю в 2.11Å.

7MFD: Entity 2 – структура MEK1, яка є найповнішою відносно заданого сиквенсу, ідентичність якої складає 100%, має E-Value 1,027e-260. Структуру було встановлено методом електронної мікроскопії з роздільною здатністю в 3.66 Å.

Для PAK1 було досліджено 27 структур і обрано одну з найбільшим

показником ідентичності, найменшим E-Value та оптимальною роздільною здатністю.

4EQC: Entity 1 – структура PAK1 з інгібітором, що найкраще репрезентує протеїнкіназу, ідентичність якої складає 99%, має E-Value $1,822e-189$. Структуру було встановлено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю в 2.01Å .

Табл 3.2. – Характеристичні дані просторових структур досліджуваних білків

Назва досліджуваного білка	Кількість експериментально встановлених структур	Максимальна роздільна здатність	Ідентичність відносно повного сиквенсу
MEK1	61	До $3,66\text{Å}$	48 – 99-100% 13 – 86-90%
PAK1	27	До $2,6\text{Å}$	27 – 99-100%
PTEN	8	До $3,2\text{Å}$	8 – 86-95%
Бета-катенін	22	До 3.029Å	22 – 100%

Для PTEN було досліджено 8 структур і обрано одну з найбільшим показником ідентичності, найменшим E-Value та оптимальною роздільною здатністю.

7JVX: Entity 1 – структура PTEN, ідентичність якої складає 95%, має E-Value $1,809e-274$. Структуру було встановлено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю в 3.2Å .

Для бета-катеніну було досліджено 22 структур і обрано дві з найбільшим показником ідентичності, найменшим E-Value та оптимальною роздільною здатністю.

7AR4: Entity 1 – структура бета-катеніну, ідентичність якої складає 95%, має E-Value $1,809e-274$. Структуру було встановлено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю в 3.2Å .

2Z6H: Entity 1 – структура бета-катеніну, що є найповнішою відносно заданого сиквенсу, ідентичність якої складає 100%, має E-Value 0. Структуру

було встановлено методом рентгеноструктурного аналізу з роздільною здатністю в 2.2 Å.

3.3. Результати аналізу білок-лігандних та білок-білкових взаємодій на поверхні цільових білків

При аналізі білкових партнерів MEK1 до уваги бралися білки зі score > 0.991; RAK1 > 0.983; PTEN > 0.994; бета-каніну > 0.999.

Основними білковими партнерами протеїнкінази MEK1 були серин/треонін-протеїнкінази, ГТФази, кіназні супресори, які є складовими, що формують мітоген-активовані протеїнкіназні каскади. У ліганд-білковій взаємодії беруть участь йони Магнію, Хлору, сульфатної групи. До органічних сполук, що беруть участь у взаємодії належать бензопірени, естери, а, також, Селуметиніб, Кобіметиніб - протипухлинні препарати, що є інгібіторами.

До білкових партнерів протеїнкінази RAK1 належать ГТФази та білки, що беруть безпосередню участь у регуляції та формування цитоскелету та передачі ядерного сигналу. У ліганд-білковій взаємодії беруть участь йони Магнію, Хлору, сульфатної групи. До органічних сполук, що беруть участь у взаємодії належать бензimidазоли та бензодіазепіни - інгібітори.

Білками-партнерами PTEN є кінази, що входять до сигнальних каскадів, що відповідають за регуляцію та формування цитоскелету, фактори адгезії білків. У ліганд-білковій взаємодії беруть участь йони фосфатної, ванадатної, сульфатної груп. До органічних сполук, що беруть участь у взаємодії належать тартарова кислота, АТФ.

Бета-катенін формує білок-білкові взаємодії з іншими структурними білками цитоскелету і компонентами Wnt/β-катенін сигнального каскаду. У ліганд-білковій взаємодії беруть участь йони Цину, Хлору. До органічних

сполук, що беруть участь у взаємодії належать сечовина, гліцерол, піперазинетансульфонова кислота.

Таблиця 3.3. – Перелік лігандів та білкових партнерів досліджуваних білків

Назва	Білкові партнери	Ліганди, (ID)
MEK1	BRAF, KSR1, MAPK1, RAF1, MAPK3, HRAS, ARAF, KSR2	SO4, QOM, ADP, QO7, AGS, LCJ, CL, MG
PAK1	RAC1, CDC42, NCK1, NCK2, GIT1, AKT1, GIT2	4PV, GOL, MG, 4OR, 59U, FLL, 0H2
PTEN	PIK3CA, MBD2, MAGI2, WWP2, NEDD4, TP53	PO4, TLA, VO4, SO4, ATP
Бета-катенін	TP53, TBL1X, SKP1, BCL9, APC, CDH1, AXIN1	P6L, CL, EPE, SO4, R9Q, IMD

3.4. Результати підготовки структур для подальшого молекулярного докінгу

В базі даних хімічних сполук PubChem було знайдено 134 сполуки авермектинів класів A1b, A1a, B1a, B1b, A2a, A2b, B2a, B2b. Було проаналізовано в загальній кількості 134 сполуки, з них було відібрано 80 для подальшого докінгу.

Структури авермектинів було іонізовано використовуючи алгоритм Ерік, для кожної зі структур було сгенеровано таутомери та стереоізомери.

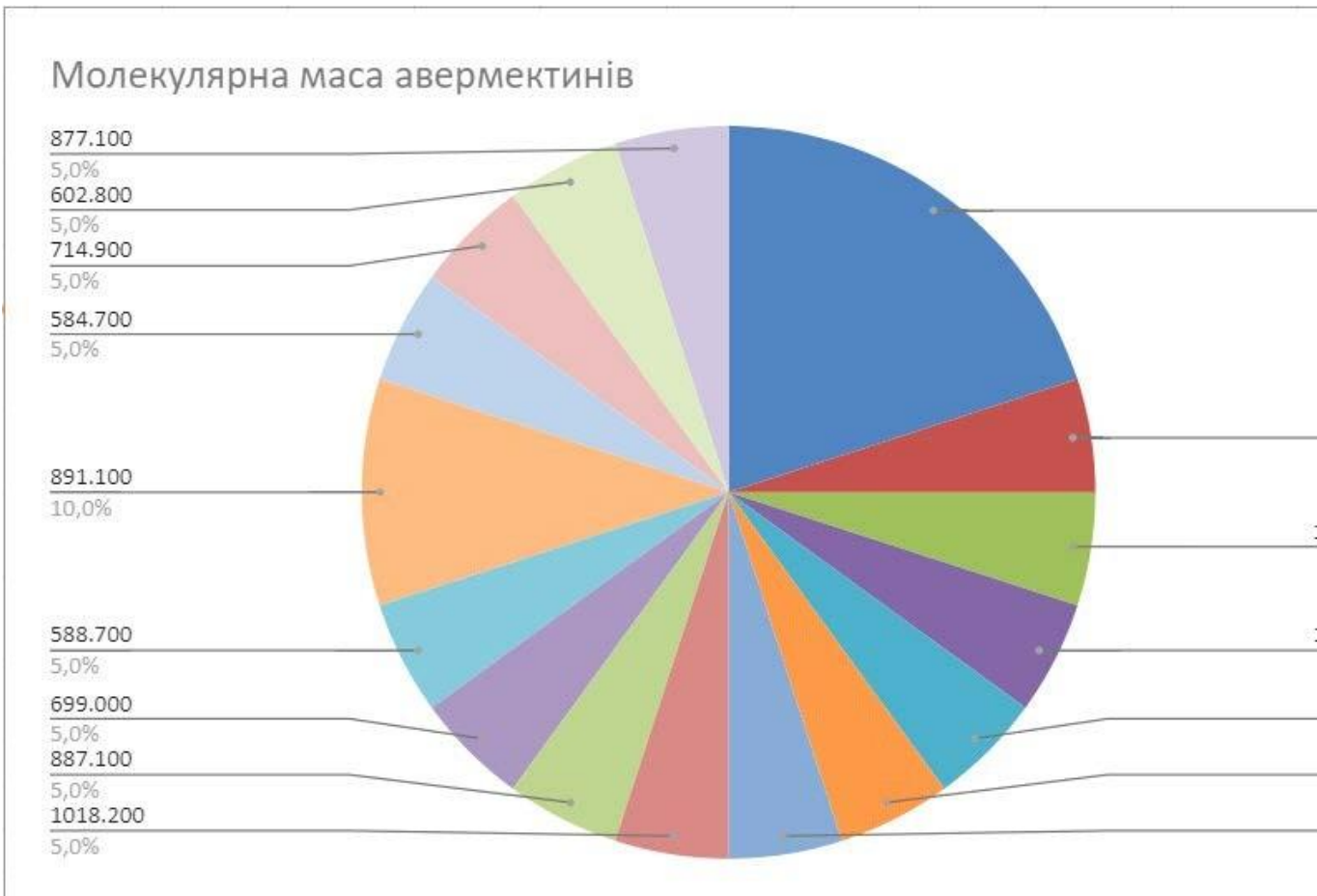


Рис 3.1 – Молекулярна маса авермектинів, що були відібрані для докінгу

Кількість важких атомів сполук

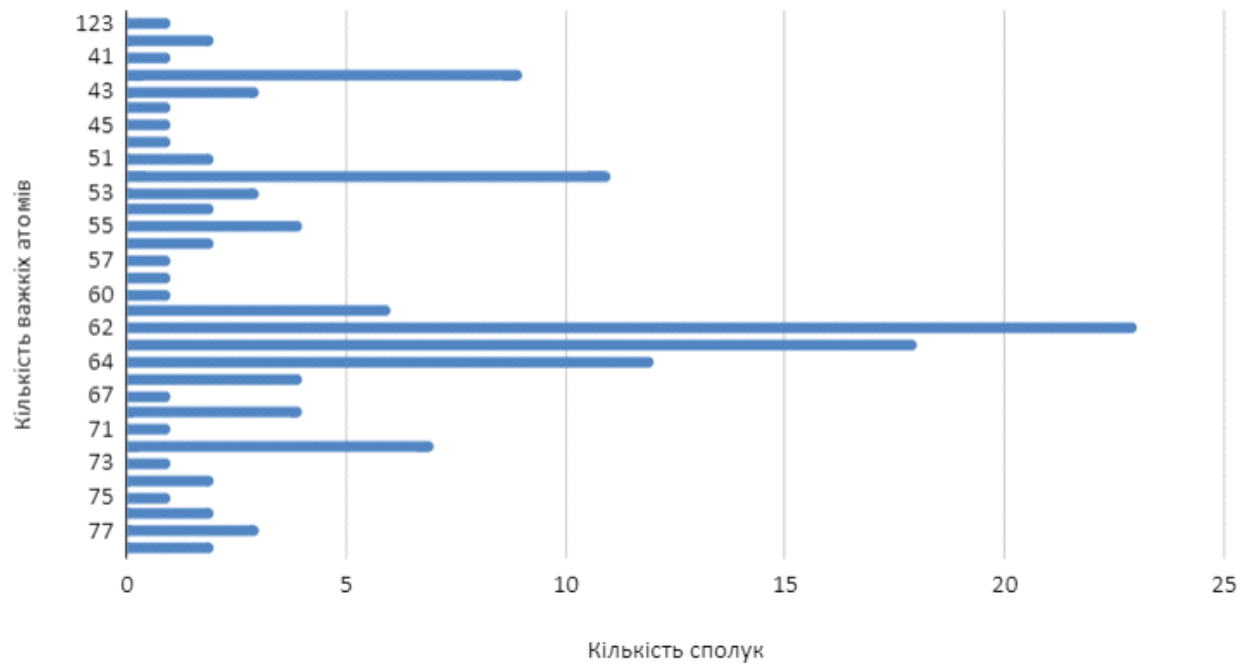


Рис 3.2 – Кількість важких атомів авермектинів, що були відібрані для докінгу

Донори водневого зв'язку

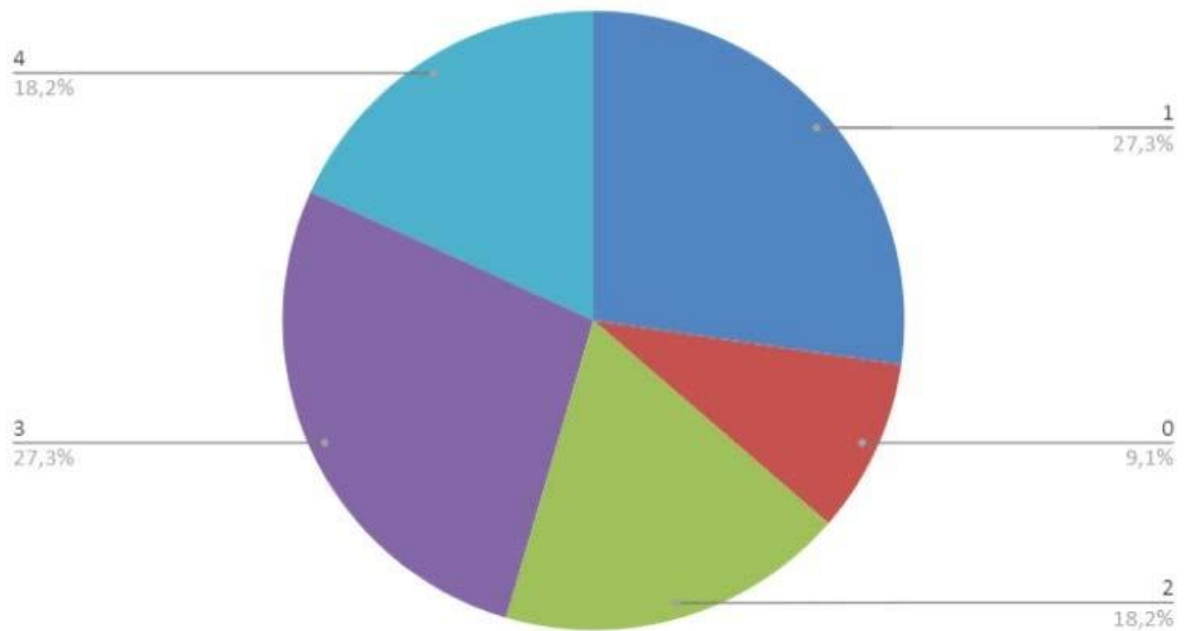


Рис 3.3 – Кількість донорів водневого зв'язку авермектинів, що були відібрані для докінгу

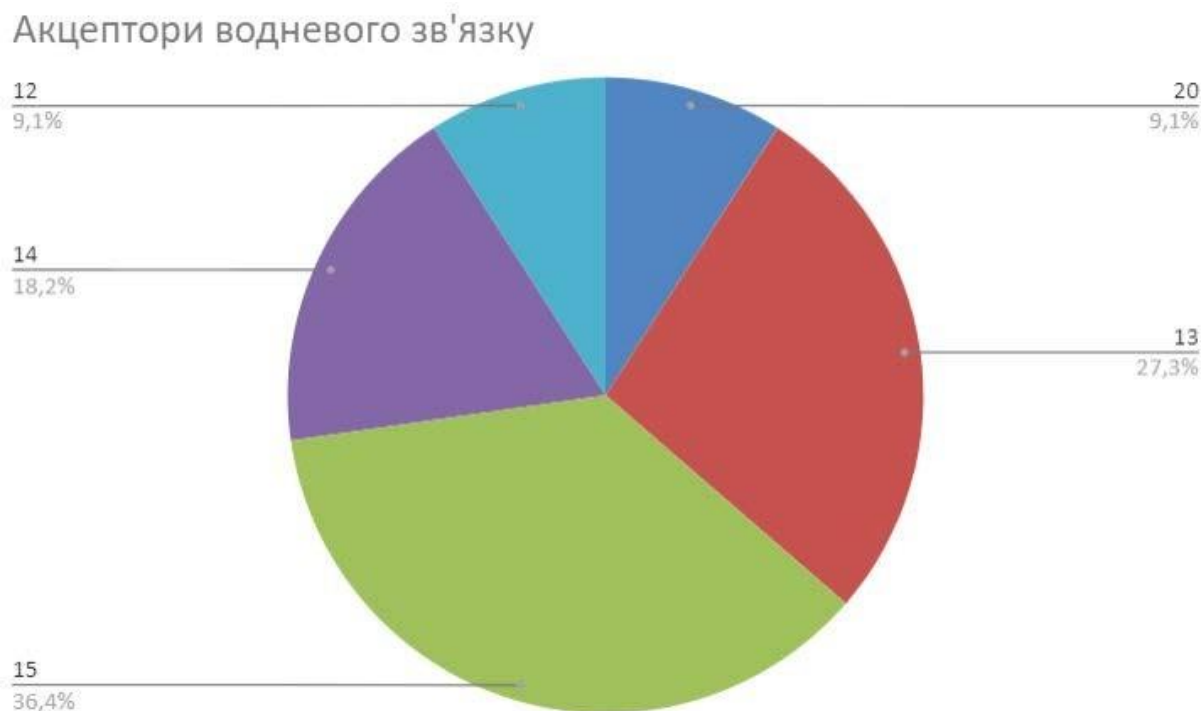


Рис 3.4 – Кількість акцепторів водневого зв'язку авермектинів, що були відібрані для докінгу

Для структур білків, що було відібрано для докінгу було відновлено структуру та оптимізовано енергію використовуючи алгоритм Rgorка при рН = 7.

Було створено карту сайту на основі наявних інгібіторів-лігандів в структурі цільових білків.

3.5. Результати докінгу

В результаті проведеного докінгу авермектинів з МЕК1 було визначено комплекси, що отримали найкращу оцінку докінгу за поданими параметрами,

до яких входять ряд наступних сполук авермектинів представлених на Рис 3.5 та названих за їх Compound CID.

Title	docking score	glide gscore	glide emodel
glide-dock_SP_MEK1_2_pv (28)			
5808883	-4.072	-4.072	-43.477
53398645	-3.785	-3.785	-43.169
78410676	-3.716	-3.716	-43.902
78410676	-3.599	-3.599	-40.437
6442826	-3.577	-3.577	-48.855
137698348	-3.446	-3.446	-38.571
78410676	-3.443	-3.443	-34.207
6442826	-3.344	-3.344	-43.037
73152347	-3.281	-3.281	-44.969
73152347	-3.259	-3.259	-39.210
73152347	-3.011	-3.011	-36.455
146157524	-2.836	-2.837	-20.854
139586219	-2.750	-2.750	-24.265
11953983	-2.736	-2.736	-26.467
6442826	-2.666	-2.666	-28.427
6443270	-2.511	-2.511	-31.529
122404563	-2.370	-2.370	-32.019
155970341	-2.349	-2.349	-36.427
122404562	-2.194	-2.194	-28.636
146157524	-2.188	-2.189	-27.822
146157524	-2.143	-2.144	-26.950
139586219	-2.108	-2.108	-22.132
73152347	-2.026	-2.026	-30.017
73152347	-1.765	-1.765	-24.403
139586219	-1.655	-1.655	-23.687
146157524	-1.488	-1.489	-17.562
11953983	-1.296	-1.296	-18.742

Рис 3.5 – Таблиця оцінки докінгу авермектин-МЕК1 за параметрами docking score, glide gscore та glide emodel

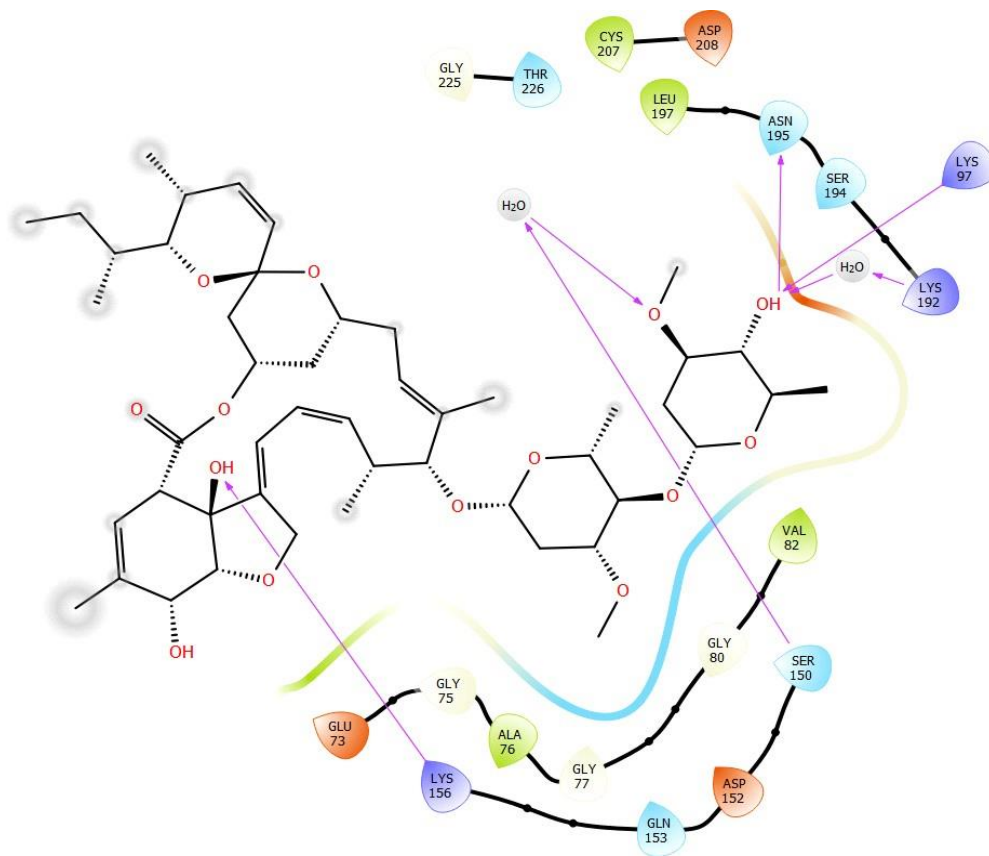


Рис 3.6 – Ліганд-білкові взаємодії найбільш результативного комплексу взаємодії MEK1-авермектину

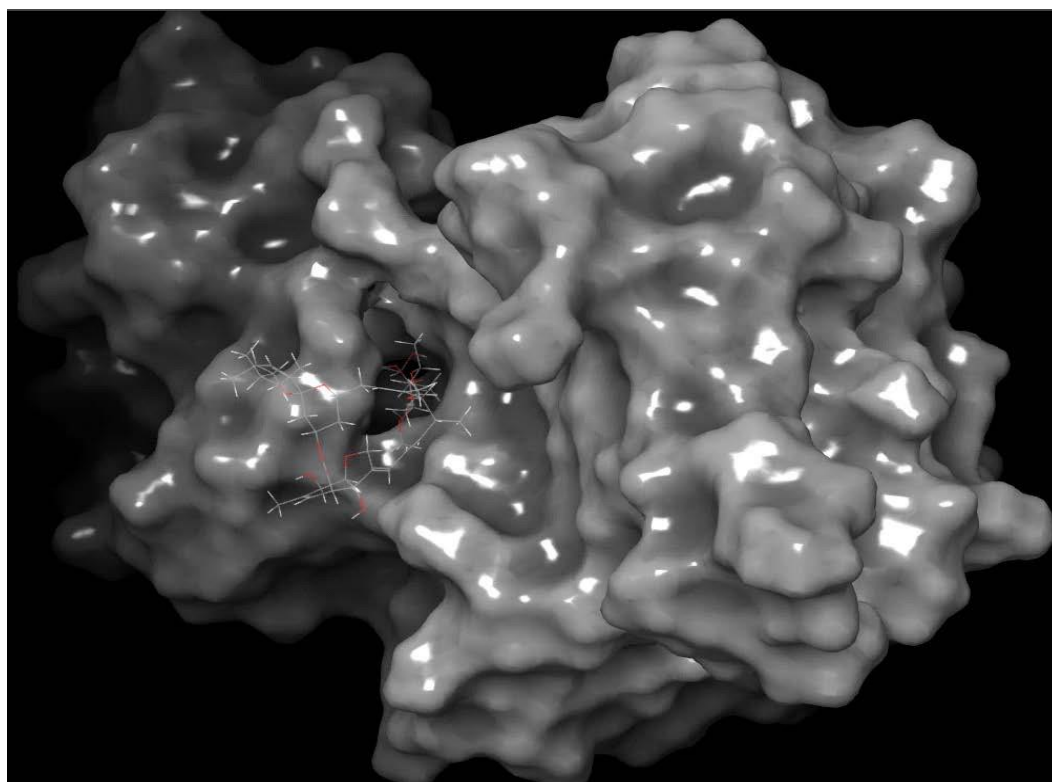


Рис 3.7 – Просторова структура найбільш результативного комплексу
МЕК1-авермектину

Найчастіше інгібітори взаємодіють з МЕК1 з такими амінокислотними залишками: 156 Lys, 97 Lys, 192 Lys, 195 ASN, 150 SER через гідроксильні та -ОНЗ групи.

В результаті проведеного докінгу авермектинів з РАК1 було визначено комплекси, що отримали найкращу оцінку докінгу за поданими параметрами, до яких входять ряд наступних сполук авермектинів представлених на Рис 3.8 та названих за їх Compound CID.

Row	In	Title	docking score	glide gscore	glide emodel
	<input checked="" type="radio"/>	glide-dock_SP_PAK1_pv (937)			
1	<input checked="" type="radio"/>	4EQC - preprocessed			
2	<input type="radio"/>	6448768	-7.034	-7.034	-72.370
3	<input type="radio"/>	6448767	-6.282	-6.282	-73.520
4	<input type="radio"/>	6448767	-6.240	-6.240	-71.120
5	<input type="radio"/>	6448767	-6.197	-6.197	-67.462
6	<input type="radio"/>	5808883	-6.182	-6.182	-63.910
7	<input type="radio"/>	78410777	-6.152	-6.152	-62.464
8	<input type="radio"/>	6448766	-6.109	-6.109	-66.289
9	<input type="radio"/>	6443887	-6.094	-6.094	-63.900
10	<input type="radio"/>	6448767	-6.093	-6.093	-65.707
11	<input type="radio"/>	6448982	-6.078	-6.078	-61.604
12	<input type="radio"/>	122404563	-6.049	-6.049	-57.344
13	<input type="radio"/>	6448982	-6.024	-6.024	-52.443
14	<input type="radio"/>	6448767	-5.982	-5.982	-71.859
15	<input type="radio"/>	122198140	-5.969	-5.970	-66.141
16	<input type="radio"/>	6448766	-5.827	-5.827	-70.319
17	<input type="radio"/>	122198140	-5.794	-5.795	-67.658
18	<input type="radio"/>	5808883	-5.777	-5.777	-62.607
19	<input type="radio"/>	44269690	-5.734	-5.734	-63.803
20	<input type="radio"/>	6448767	-5.714	-5.714	-74.308

Рис 3.8 – Таблиця оцінки докінгу авермектин-РАК1 за параметрами docking score, glide gscore та glide emodel

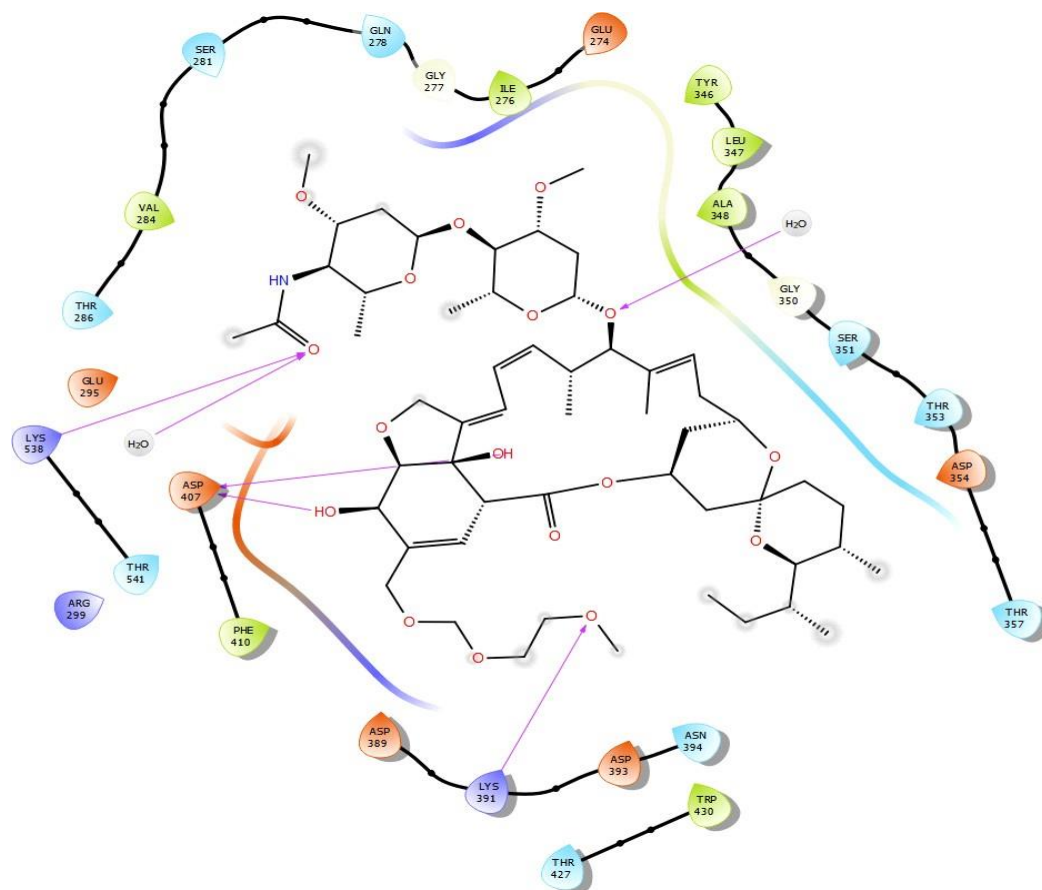


Рис 3.9 – Ліганд-білкові взаємодії найбільш результативного комплексу взаємодії РАК1-авермектину

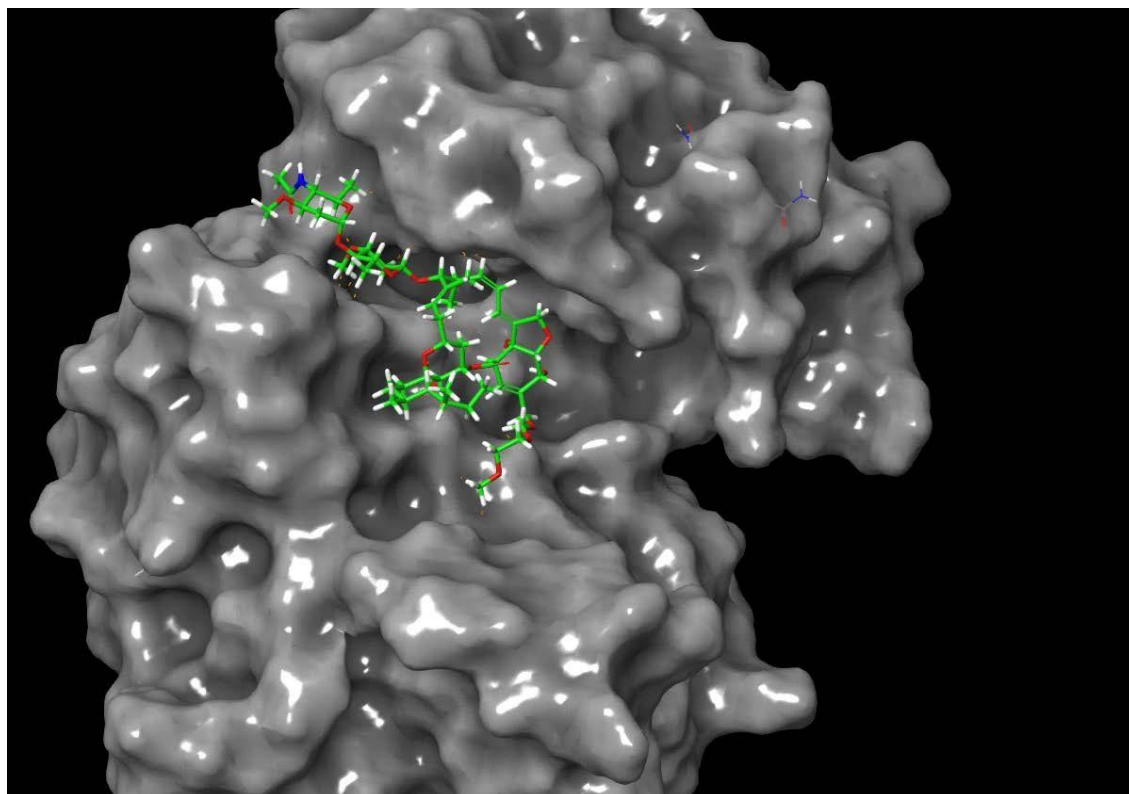


Рис 3.10. – Просторова структура найбільш результативного комплексу
РАК1-авермектину

Найчастіше спостерігається взаємодія інгібіторів з РАК1 за амінокислотними залишками: 407 ASP, 391 LYS, 538 LYS через гідроксильні, карбоксильні та -ОНЗ групи.

В результаті проведеного докінгу авермектинів з РТЕН було визначено комплекси, що отримали найкращу оцінку докінгу за поданими параметрами, до яких входять ряд наступних сполук авермектинів представлених на Рис 3.11 та названих за їх Compound CID.

Row	In	Title	docking score	glide gscore	glide emodel
	<input checked="" type="radio"/>	glide-dock_SP_PTEN_2_pv (271)			
1	<input checked="" type="radio"/>	7JYX - preprocessed			
2	<input type="radio"/>	6443270	-4.973	-4.973	-48.441
3	<input type="radio"/>	6448767	-4.660	-4.660	-47.357
4	<input type="radio"/>	47531	-4.491	-4.491	-44.344
5	<input type="radio"/>	73152347	-4.186	-4.186	-44.719
6	<input type="radio"/>	6443887	-4.184	-4.184	-43.808
7	<input type="radio"/>	44269694	-4.134	-4.134	-47.547
8	<input type="radio"/>	155970341	-4.061	-4.061	-40.419
9	<input type="radio"/>	73152347	-3.971	-3.971	-42.632
10	<input type="radio"/>	11953989	-3.929	-3.929	-42.739
11	<input type="radio"/>	14524860	-3.922	-3.922	-42.677
12	<input type="radio"/>	155970341	-3.906	-3.906	-43.441
13	<input type="radio"/>	118701691	-3.899	-3.899	-42.522
14	<input type="radio"/>	73152347	-3.881	-3.881	-44.672
15	<input type="radio"/>	6448767	-3.863	-3.863	-36.586
16	<input type="radio"/>	6221814	-3.811	-3.811	-43.434
17	<input type="radio"/>	44269690	-3.793	-3.793	-42.691
18	<input type="radio"/>	73152347	-3.698	-3.698	-41.461
19	<input type="radio"/>	73152347	-3.661	-3.661	-39.931
20	<input type="radio"/>	11953980	-3.606	-3.606	-41.272

Рис 3.11 – Таблиця оцінки докінгу авермектин-РТЕН за параметрами docking score, glide gscore та glide emodel

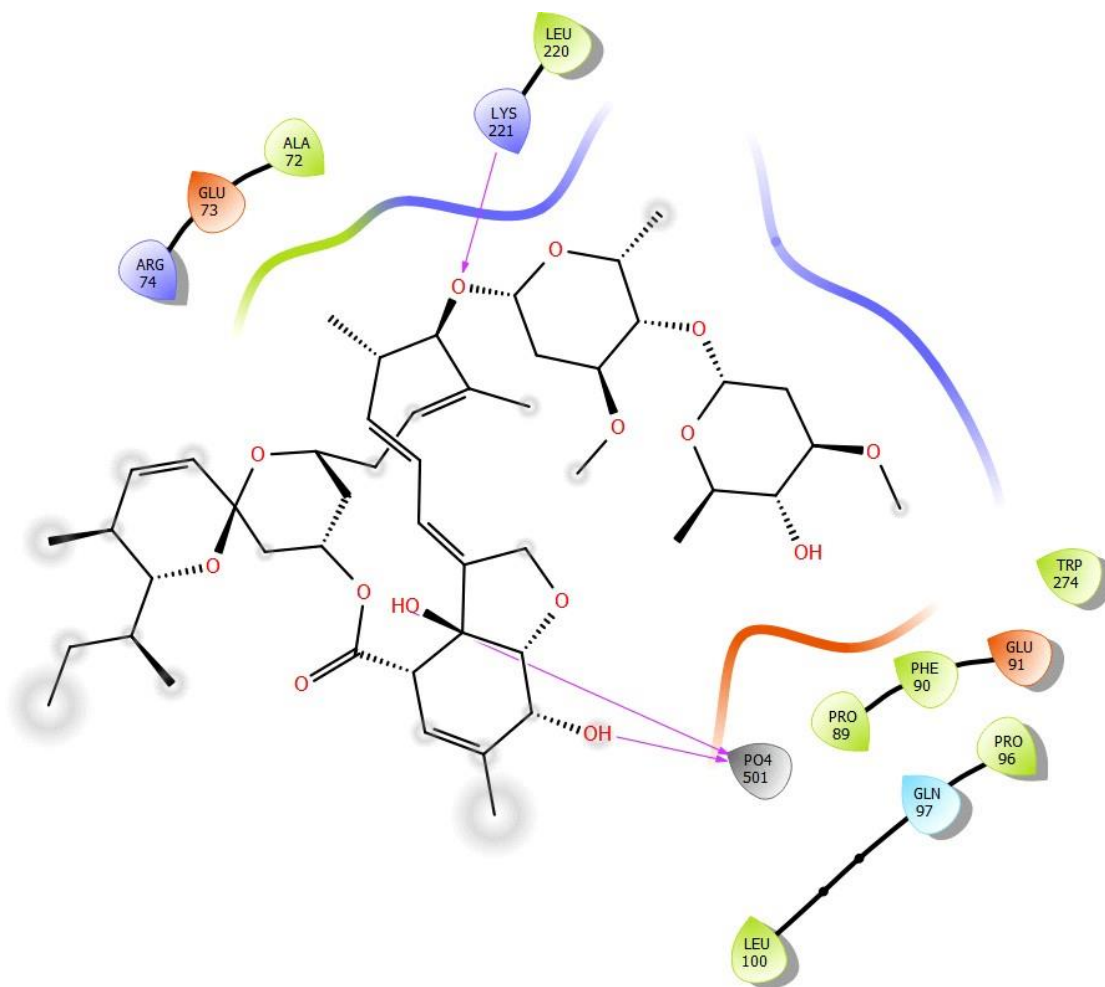


Рис 3.12 – Ліганд-білкові взаємодії найбільш результативного комплексу взаємодії PTEN-авермектину

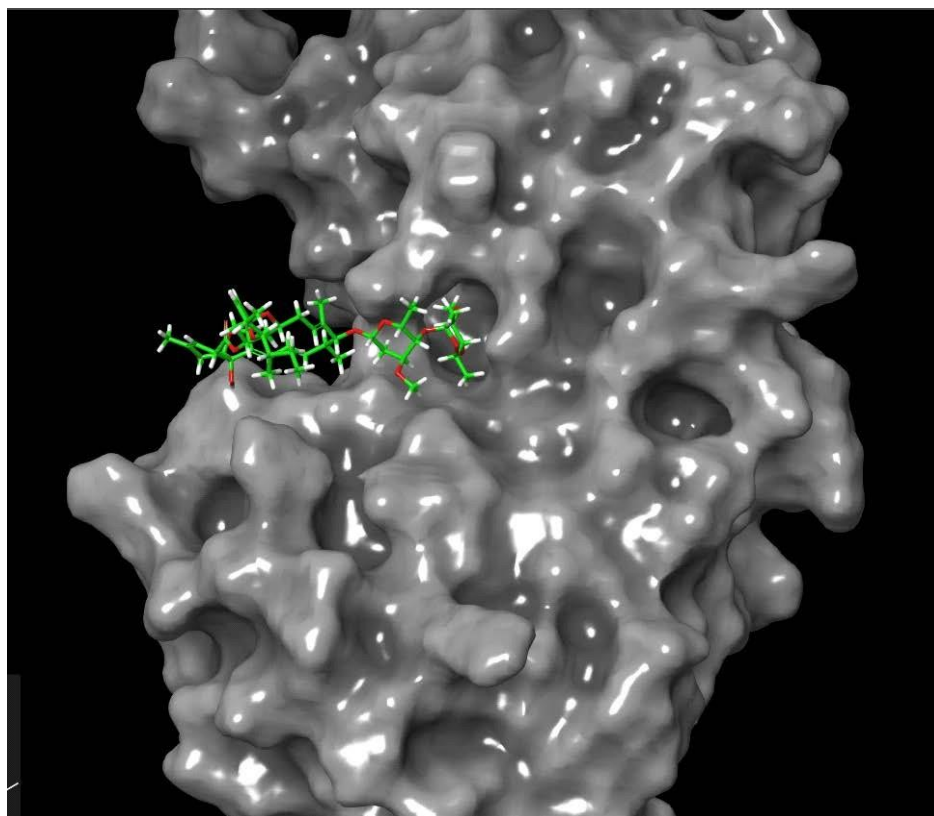


Рис 3.13 – Просторова структура найбільш результативного комплексу
PTEN-авермектину

Найчастіше спостерігається взаємодія інгібіторів з PTEN за амінокислотними залишками: 91 GLU, 87 GLN, 89 PRO, 221 LYS дуже часто через гідроксильні, рідше через карбоксильні групи.

В результаті проведеного докінгу авермектинів з бета-катеніном було визначено комплекси, що отримали найкращу оцінку докінгу за поданими параметрами, до яких входять ряд наступних сполук авермектинів представлених на Рис 3.5 та названих за їх Compound CID.

Row	In	Title	docking score	glide gscore	glide emodel
1	●	glide-dock_SP_catenine_2_pv (935)			
1	●	7AR4 - hbond-opt			
2	○	6448766	-6.332	-6.332	-84.776
3	○	6448768	-6.116	-6.116	-62.475
4	○	6448768	-6.035	-6.035	-71.699
5	○	6448768	-6.033	-6.033	-72.472
6	○	6448767	-5.981	-5.981	-60.363
7	○	6448766	-5.877	-5.877	-62.792
8	○	6448766	-5.801	-5.801	-64.200
9	○	6448766	-5.730	-5.730	-67.973
10	○	6448766	-5.638	-5.638	-59.830
11	○	6448766	-5.627	-5.627	-65.325
12	○	6448767	-5.624	-5.624	-61.196
13	○	6448766	-5.623	-5.623	-57.888
14	○	6448768	-5.609	-5.609	-57.502
15	○	6448766	-5.601	-5.601	-61.937
16	○	6448983	-5.589	-5.589	-61.081
17	○	6448766	-5.534	-5.534	-58.062
18	○	6221814	-5.478	-5.478	-59.478
19	○	6448766	-5.467	-5.467	-61.442
20	○	78410777	-5.354	-5.354	-52.605

Рис 3.14 – Таблиця оцінки докінгу бета-катенін–авермектин за параметрами docking score, glide gscore та glide emodel

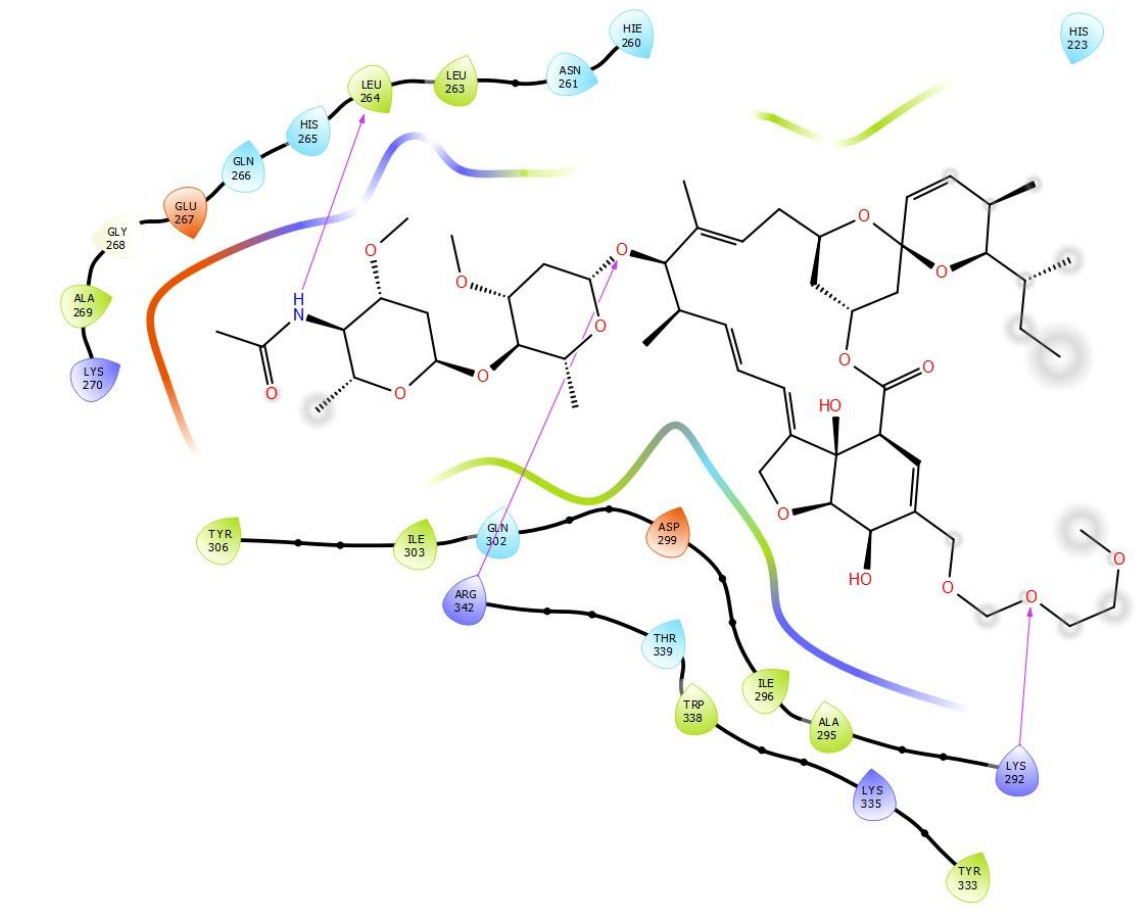


Рис 3.15 – Ліганд-білкові взаємодії найбільш результативного комплексу взаємодії бета-катенін–авермектину

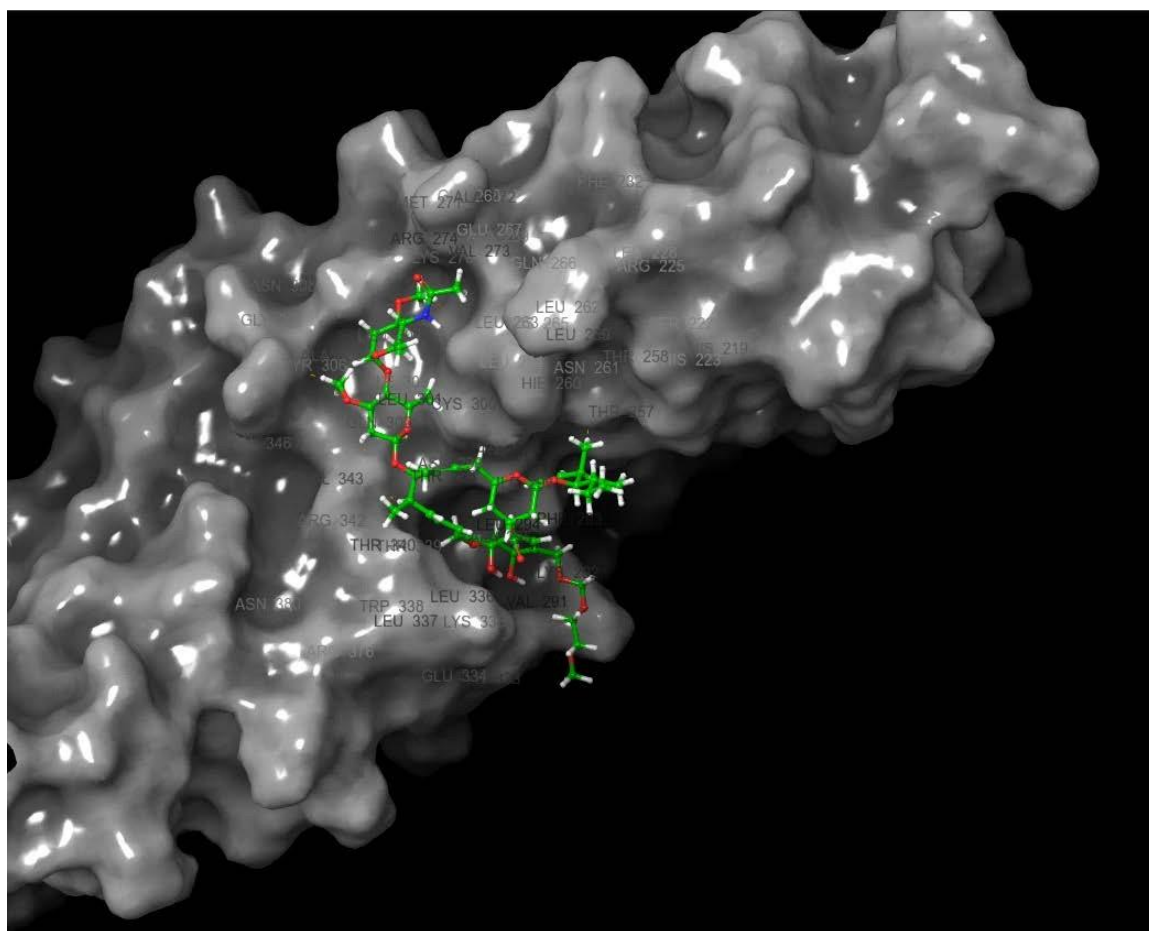


Рис 3.16 – Просторова структура найбільш результативного комплексу бета-катенін–авермектину

Найчастіше спостерігається взаємодія інгібіторів з бета-катеніном за аміноклотними залишками: 292 LYS, 333 TYR, 220 ASN, 180 LYS через гідроксильні, карбоксильні та -OCH₃ групи, також зустрічаються випадки взаємодії через імідну групу, як вказано на Рис 3.15.

Враховуючи великий розмір молекул авермектину відносно активного центру білків, до яких вони були доковані, можна сказати, що можуть перекривати ділянки активного центру, тим самим інгібуючи їх каталітичні функції.

ВИСНОВКИ

- Виконано дослідження порівняння протеїназ різних царств. На основі результатів аналізу порівняння протеїназ було встановлено, що протеїнази людини по відношенню до ортологів грибів та рослин є консервативними.
- На основі структур, що було доведено кристалографічним методом встановлено особливості просторової структури протеїназ, зокрема їх доменну будову та, враховуючи дані білкових баз даних, було охарактеризовано сайти взаємодій, на основі яких проведено молекулярний докінг.
- Проаналізовано відомі авермектини, їх гомологи та похідні, встановлено їх ефективність при зв'язуванні з сайтами, відібрані ті авермектини, що мають найвищу ефективність, встановлено особливості зв'язування молекул. Проведено оптимізацію та конструювання тривимірної структури авермектинів, що були отримані з хімічних баз даних, згенеровано їх таутомери та стереоізомери.
- Проведено молекулярний докінг авермектинів з цільовими білками, встановлено амінокислотні залишки білків та функціональні групи авермектинів, а саме гідроксильні та карбоксильні, що беруть активну участь у формуванні взаємодій. Ефект інгібування, ймовірно, виникає внаслідок взаємодії авермектину з амінокислотами каталітичного домену, а також від перекриття авермектином ділянок активного центру.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong YL, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Omura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979 Mar;15(3):361-7. doi: 10.1128/AAC.15.3.361. PMID: 464561; PMCID: PMC352666.
- Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH, Yancopoulos GD. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell.* 1991 May 17;65(4):663-75. doi: 10.1016/0092-8674(91)90098-j. PMID: 2032290.
- Kyriakis JM, Banerjee P, Nikolakaki E, Dai T, Rubie EA, Ahmad MF, Avruch J, Woodgett JR. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature.* 1994 May 12;369(6476):156-60. doi: 10.1038/369156a0. PMID: 8177321.
- Pagès G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8319-23. doi: 10.1073/pnas.90.18.8319. PMID: 8397401; PMCID: PMC47347.
- Ci X, Li H, Yu Q, Zhang X, Yu L, Chen N, Song Y, Deng X. Avermectin exerts anti-inflammatory effect by downregulating the nuclear transcription factor kappa-B and mitogen-activated protein kinase activation pathway. *Fundam Clin Pharmacol.* 2009 Aug;23(4):449-55. doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00684.x. Epub 2009 May 6. PMID: 19453757.
- Flores K, Yadav SS, Katz AA, Seger R. The Nuclear Translocation of Mitogen-Activated Protein Kinases: Molecular Mechanisms and Use as Novel

Therapeutic Target. *Neuroendocrinology*. 2019;108(2):121-131. doi: 10.1159/000494085. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30261516.

- Plotnikov A, Flores K, Maik-Rachline G, Zehorai E, Kapri-Pardes E, Berti DA, Hanoch T, Besser MJ, Seger R. The nuclear translocation of ERK1/2 as an anticancer target. *Nat Commun*. 2015 Mar 30;6:6685. doi: 10.1038/ncomms7685. PMID: 25819065.
- Liao Y, Hung MC. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res*. 2010 Jan 1;2(1):19-42. PMID: 20182580; PMCID: PMC2826820.
- Riquelme I, Tapia O, Espinoza JA, Leal P, Buchegger K, Sandoval A, Bizama C, Araya JC, Peek RM, Roa JC. The Gene Expression Status of the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Gastric Cancer Tissues and Cell Lines. *Pathol Oncol Res*. 2016 Oct;22(4):797-805. doi: 10.1007/s12253-016-0066-5. Epub 2016 May 7. PMID: 27156070; PMCID: PMC5890336.
- Cheng TC, Din ZH, Su JH, Wu YJ, Liu CI. Sinulariolide Suppresses Cell Migration and Invasion by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/-9 and Urokinase through the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Human Bladder Cancer Cells. *Mar Drugs*. 2017 Aug 2;15(8):238. doi: 10.3390/md15080238. PMID: 28767067; PMCID: PMC5577593.
- Perugorria MJ, Olaizola P, Labiano I, Esparza-Baquer A, Marzioni M, Marin JJG, Bujanda L, Banales JM. Wnt- β -catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Feb;16(2):121-136. doi: 10.1038/s41575-018-0075-9. PMID: 30451972.
- Skronska-Wasek W, Mutze K, Baarsma HA, Bracke KR, Alsafadi HN, Lehmann M, Costa R, Stornaiuolo M, Novellino E, Brusselle GG, Wagner DE, Yildirim AÖ, Königshoff M. Reduced Frizzled Receptor 4 Expression Prevents WNT/ β -Catenin-driven Alveolar Lung Repair in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017 Jul 15;196(2):172-185. doi: 10.1164/rccm.201605-0904OC. PMID: 28245136.

- Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*. 2017 Jun 1;169(6):985-999. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.016. PMID: 28575679.
- Cruciat CM, Niehrs C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Mar 1;5(3):a015081. doi: 10.1101/cshperspect.a015081. PMID: 23085770; PMCID: PMC3578365.
- Zhu T, Liu X, Song J, Li D, Pang XJ, Wang SH, Li QR, Fu DJ, Zhang SY, Xie HZ. Ras/Raf/MEK/ERK pathway axis mediated neurotoxicity induced by high-risk pesticide residue-Avermectin. *Environ Toxicol*. 2021 May;36(5):984-993. doi: 10.1002/tox.23086. Epub 2020 Dec 31. PMID: 33381906.
- Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 2000 Feb 18;100(4):387-90. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80674-1. PMID: 10693755.
- Yuan B, Zou M, Zhao Y, Zhang K, Sun Y, Peng X. Up-Regulation of miR-130b-3p Activates the PTEN/PI3K/AKT/NF- κ B Pathway to Defense against *Mycoplasma gallisepticum* (HS Strain) Infection of Chicken. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 25;19(8):2172. doi: 10.3390/ijms19082172. PMID: 30044397; PMCID: PMC6121889.
- Behnen M, Leschczyk C, Möller S, Batel T, Klinger M, Solbach W, Laskay T. Immobilized immune complexes induce neutrophil extracellular trap release by human neutrophil granulocytes via Fc γ RIIIB and Mac-1. *J Immunol*. 2014 Aug 15;193(4):1954-65. doi: 10.4049/jimmunol.1400478. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25024378.
- Ebi H, Costa C, Faber AC, Nishtala M, Kotani H, Juric D, Della Pelle P, Song Y, Yano S, Mino-Kenudson M, Benes CH, Engelman JA. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Dec 24;110(52):21124-9. doi: 10.1073/pnas.1314124110. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24327733; PMCID: PMC3876254.

- DeSouza-Vieira T, Guimarães-Costa A, Rochael NC, Lira MN, Nascimento MT, Lima-Gomez PS, Mariante RM, Persechini PM, Saraiva EM. Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3K γ , ERK, PI3K σ , PKC, and [Ca²⁺]. *J Leukoc Biol*. 2016 Oct;100(4):801-810. doi: 10.1189/jlb.4A0615-261RR. Epub 2016 May 6. PMID: 27154356; PMCID: PMC5014744.
- Wang K, Gao W, Dou Q, Chen H, Li Q, Nice EC, Huang C. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. *Autophagy*. 2016 Dec;12(12):2498-2499. doi: 10.1080/15548627.2016.1231494. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27657889; PMCID: PMC5173258.
- Takai H, Xie Y, de Lange T, Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev*. 2010 Sep 15;24(18):2019-30. doi: 10.1101/gad.1956410. Epub 2010 Aug 27. PMID: 20801936; PMCID: PMC2939364.
- Hibbs RE, Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011 Jun 2;474(7349):54-60. doi: 10.1038/nature10139. Epub 2011 May 15. PMID: 21572436; PMCID: PMC3160419.
- Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem*. 2010 Jun 25;285(26):20109-16. doi: 10.1074/jbc.M110.121699. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427287; PMCID: PMC2888423.
- Petherick KJ, Williams AC, Lane JD, Ordóñez-Morán P, Huelsken J, Collard TJ, Smartt HJ, Batson J, Malik K, Paraskeva C, Greenhough A. Autolysosomal β -catenin degradation regulates Wnt-autophagy-p62 crosstalk. *EMBO J*. 2013 Jul 3;32(13):1903-16. doi: 10.1038/emboj.2013.123. Epub 2013 Jun 4. PMID: 23736261; PMCID: PMC3981178.
- Dou Q, Chen HN, Wang K, Yuan K, Lei Y, Li K, Lan J, Chen Y, Huang Z, Xie N, Zhang L, Xiang R, Nice EC, Wei Y, Huang C. Ivermectin

Induces Cytostatic Autophagy by Blocking the PAK1/Akt Axis in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2016 Aug 1;76(15):4457-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2887. Epub 2016 Jun 14. PMID: 27302166.

- Moreno-Hagelsieb G, Latimer K. Choosing BLAST options for better detection of orthologs as reciprocal best hits. *Bioinformatics.* 2008 Feb 1;24(3):319-24. doi: 10.1093/bioinformatics/btm585. Epub 2007 Nov 26. PMID: 18042555.

- Burley SK, Bhikadiya C, Bi C, Bittrich S, Chen L, Crichlow GV, Christie CH, Dalenberg K, Di Costanzo L, Duarte JM, Dutta S, Feng Z, Ganesan S, Goodsell DS, Ghosh S, Green RK, Guranović V, Guzenko D, Hudson BP, Lawson CL, Liang Y, Lowe R, Namkoong H, Peisach E, Persikova I, Randle C, Rose A, Rose Y, Sali A, Segura J, Sekharan M, Shao C, Tao YP, Voigt M, Westbrook JD, Young JY, Zardecki C, Zhuravleva M. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D437-D451. doi: 10.1093/nar/gkaa1038. PMID: 33211854; PMCID: PMC7779003.

- Polanski J, Tkocz A, Kucia U. Beware of ligand efficiency (LE): understanding LE data in modeling structure-activity and structure-economy relationships. *J Cheminform.* 2017 Sep 11;9(1):49.

- Chen D, Oezguen N, Urvil P, Ferguson C, Dann SM, Savidge TC. Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci Adv.* 2016 Mar 25;2(3):e1501240. doi: 10.1126/sciadv.1501240. PMID: 27051863; PMCID: PMC4820369.

- Kumar BK, Faheem, Sekhar KVGC, Ojha R, Prajapati VK, Pai A, Murugesan S. Pharmacophore based virtual screening, molecular docking, molecular dynamics and MM-GBSA approach for identification of prospective SARS-CoV-2 inhibitor from natural product databases. *J Biomol Struct Dyn.* 2022

Feb;40(3):1363-1386. doi: 10.1080/07391102.2020.1824814. Epub 2020 Sep 28.
PMID: 32981461; PMCID: PMC7544939.

ДОДАТКИ

Додаток 1

Послідовність амінокислот білків, що використовувались для аналізу з позначеними сайтами зв'язування

sp|Q02750|MP2K1_HUMAN

MPKKKPTPIQLNPAPDGSVAVNGTSSAETNLEALQKKLELELELDEQQQRKLEAFFLTQKQKV
GELKDDDFEKISELGAGNGGVVFKVSHKPSGLVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHE
CNSPYIVGFYGAFYSDGEISICMEHMDGGSGLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL
REKHKIMHRDVKPSNILVNSRGEIKLCDFGVSGQLIDSMANSFVGTRSYMSPERLQGTHY
SVQSDIWSMGLSLVEMAVGRYPIPPDAKELELMFGCQVEGDAAEPPRPRTTPGRPLSSY
GMSRPPMAIFELLDYIVNEPPPKLPSGVFSLEFQDFVNKCLIKNPAERADLKQLMVHAF
IKRSDAEVDFAGWLCSTIGLNQPSTPTHAAAGV

sp|Q13153|PAK1_HUMAN

MSNNGLDIQDKPPAPPMRNTSTMIGAGSKDAGTLNHGSKPLPPNPEEKKKKDRFYRSILP
GDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFDAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNITKSEQKN
PQAVLDVLEFYNSKKTSSNSQKYSFTDKSAEDYNSSNALNVKAVSETPAVPPVSEDEDDD
DDDATPPPVIAPRPEHTKSVYTRSVIEPLVPTPTRDVATSPISPTENNTTPPDALTRNTE
KQKKKPKMSDEEILEKLSIVSVGDPKKKYTRFEKIGQGASGTVYTAMDVATGQEVAIKQ
MNLQQQPKKELINEILVMRENKNPNIVNYLDSYLVGDELWVVMYLAGGSLTDVVTETC
MDEGQIAAVCRECLQALEFLHSNQVIHRDIKSDNILLGMDGSVKLTDGFCAQITPEQSK
RSTMVGTPTYWMAPEVTRKAYGPKVDIWSLGIMAIEMIEGEPYLNENPLRALYLIATNG
TPELQNPKEKLSAIFRDFLNRCLEMDVEKRGSAKELLQHQLKIAKPLSSLTPLIAAAKEA
TKNNH

sp|P60484|PTEN_HUMAN

MTAIIKEIVSRNKRRYQEDGFDLDTYIYPNIIAMGFPAERLEGVYRNNIDDVVRFLDSK
HKNHYKIYNLCAERHYDTAKFNCRVAQYPFEHNNPPQLELIKPFCELDQWLSEDDNHVA
AIHCAGKGRGTVMICAYLLHRGKFLKAQEALDFYGEVTRDKKGVTIQRRYVYYSY
LLKNHLDYRVPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQLKVKIYSSNSGPTREDKFMY
FEFPQPLPVCVDIKVEFFHKQNKMLKKDKMFHFWVNTFFIPGPEETSEKVENGLCDQEI
DSICSIERADNDKEYLVLTLTKNLDKANKDKANRYFSPNFVKLYFTKTVEEPSNPEAS
SSTSVPDPVSDNEPDHYRYSDTTDSDPENEPFDEDQHTQITKV

sp|P35222|CTNB1_HUMAN

MATQADLMELDMAMEPDRKAAVSHWQQSYLDSGIHSGATTAPSLSGKGNPEEEDVDTS
QVLYEWEQGFSSQFTQEQVADIDGQYAMTRAQRVRAAMFPETLDEGMQIPSTQFDDAAHPT
NVQRLAEPQMLKHAVVNLINYQDDAELATRAIPELTKLNDQVQVVKAAVMVHQLSK
KEASRHAIMRSPQMVSAIVRTMQNTNDVETARCTAGTLHNLSSHREGLLAIFKSGGIPAL
VKMLGSPVDSVLFYAITTLHNLHLLHQEGAKMAVRLAGGLQKMLVALLNKTNVKFLAITTDC
LQILAYGNQESKLIILASGGPQALVNIMRITYTYEKLLWTTSRVLKVLVSVCSNKPATIVEA
GGMQALGLHLTDPSQRLVQNCWTLRNLSDAATKQEGMEGLLGLTLVQLLGSDDINVVTCA
AGILSNLTCNNYKNKMMVCQVGGIEALVRTVLRAGDREDITEPAICALRHLSRHQEAEM
AQNAVRLHYGLPVVVKLLHPPSHWPLIKATVGLIRNLALCPANHAPLREQGAI PRLVQLL
VRAHQDTQRRTSMGGTQQQFVEGVRMEEIVEGCTGALHILARDVHNRIVIRGLNTIPLFV
QLLYSPIENIQRVAAGVLCQELQDKEAAEAIEAEGATAPLTELHLSRNEGVATYAAAVLF
RMSEDKPQDYKRLSVELTSSFRTEPMAWNETADLGLDIGAQGEPLGYRQDDPSYRSFH
SGGYQDALGMDPMEHEMGGHHPGADYPVDGLPDLGHAQDLMDGLPPGDSNQLAWFDTDL