УДК 004.94+547.7+616-006+616-085

IN SILICO ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЫСОКОАФФИННЫХ ЛИГАНДОВ БЕЛКА KasA МИКОБАКТЕРИИ M.TUBERCULOSIS – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЛЕКАРСТВЕННО-УСТОЙЧИВЫХ ФОРМ ТУБЕРКУЛЕЗА

А.М. Андрианов[1], К.В. Фурс[2], А.М. Юшкевич[2], А.В. Гончар[2], А. Габриэлян[3], А. Розенталь[3], А.В. Тузиков [2]

[1]*Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси, ул. ак. Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь*,
alexande.andriano@yandex.ru
[2]*Объединенный институт проблем информатики, Национальная академия наук Беларуси, 220012, ул. Сурганова, 6, Минск, Республика Беларусь*,
tuzikov@newman.bas-net.by
[3]*Управление киберинфраструктуры и вычислительной биологии, Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США*

Методами молекулярного моделирования осуществлен виртуальный скрининг потенциальных ингибиторов лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, способных блокировать белок KasA – один из ключевых ферментов, участвующих в биосинтезе компонентов клеточной стенки микобактерии M.tuberculosis. Проведена *in silico* оценка эффективности связывания белка KasA с соединениями из баз данных DrugBank, ZINC15 и Selleck Chemicals. Идентифицированы шесть молекул, проявляющих высокую аффинность связывания с каталитическим сайтом фермента. Показано, что эти соединения формируют перспективные базовые структуры для разработки новых антибактериальных препаратов для лечения лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Ключевые слова. Лекарственно-устойчивый туберкулез; белок KasA; ингибиторы M.tuberculosis; виртуальный скрининг; молекулярное моделирование; антибактериальные препараты.

IN SILICO IDENTIFICATION OF HIGH AFFINITY LIGANDS OF THE KasA PROTEIN OF M.TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA PRESENTING POTENTIAL INHIBITORS OF DRUG-RESISTANT TUBERCULOSIS FORMS

A.M. Andrianov[a], K.V. Furs[b], A.M., Yushkevich[b], A.V. Gonchar[b], A. Gabrielian[c], A. Rosenthal[c], A.V. Tuzikov[b]

[a]*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ac. Kuprevich str., 5/2, Surganov str., Minsk, Republic of Belarus,*
alexande.andriano@yandex.ru

[b]*United Institute of Informatics Problems, National Academy of Sciences of Belarus, Surganov str., 6, Minsk, Republic of Belarus*
[c]*Office of Cyber Infrastructure & Computational Biology, National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

Using molecular modeling methods, a virtual screening of potential inhibitors of drug-resistant forms of tuberculosis able to block the KasA protein, one of the key enzymes involved in the biosynthesis of the components of the cell wall of mycobacterium M.tuberculosis, was carried out. An *in silico* assessment of the binding efficiency of the KasA protein to compounds from the databases DrugBank, ZINC15 and Selleck Chemicals was performed. Six molecules exhibiting a high binding affinity to the enzyme catalytic site have been identified. These compounds are shown to form good scaffolds for the development of novel antibacterial drugs for the treatment of drug-resistant tuberculosis.

Keywords: Drug-resistant tuberculosis; KasA protein; M.tuberculosis inhibitors; virtual screening; molecular modeling; antibacterial drugs.

Введение

Согласно Докладу Всемирной организации здравоохранения о глобальной борьбе с туберкулезом в 2021 г., пандемия COVID-19 серьезно подорвала успехи, достигнутые в борьбе с этим заболеванием во всем мире: впервые за более чем десять лет показатели смертности от туберкулеза возросли. Так, в 2020 г. от туберкулеза скончались 1,5 млн. человек (включая 214 000 пациентов с ВИЧ) и, по модельным прогнозам ВОЗ, в 2021 и 2022 гг. число заболевших и умерших в результате инфицирования туберкулезом людей будет гораздо выше (WHO. 2021, Global Tuberculosis Report). Туберкулез по-прежнему входит в десятку основных причин смертей во всем мире и является основной причиной гибели пациентов с ВИЧ и сахарным диабетом, что в первую очередь связано с резистентностью к используемым в клинической практике противомикробным препаратам. Увеличение распространенности лекарственной устойчивости представляет серьезную проблему для эффективной борьбы с туберкулезом. В связи с этим, одним из ключевых вызовов, стоящих перед научным сообществом, является лечение туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, что обусловливает актуальность, важность и практическую значимость исследований по разработке новых эффективных ингибиторов микобактерии M.tuberculosis – этиологического агента туберкулеза.

Целью работы является идентификация методами виртуального скрининга и молекулярного моделирования новых потенциальных ингибиторов лекарственно-устойчивых форм туберкулеза, терапевтическое действие которых основано на блокаде белка KasA – одного из ключевых

ферментов, участвующих в биосинтезе компонентов клеточной стенки микобактерии M.tuberculosis.

Задачи исследования:

1) Молекулярный докинг соединений из виртуальной молекулярной библиотеки, составленной их химических соединений баз данных DrugBank (https://go.drugbank.com/), ZINC15 (https://zinc.docking.org/) и Selleck Chemicals (https://www.selleckchem.com/), с каталитическим центром фермента KasA микобактерии M.tuberculosis;

2) оценка аффинности связывания комплексов лиганд/KasA с помощью трех разных оценочных функций;

3) расчеты экспоненциального консенсусного ранга (ECR) [1] для каждого соединения и выбор лигандов с лучшими значениями ECR для их дальнейшего анализа методами молекулярной динамики;

4) молекулярная динамика (МД) комплексов лиганд/KasA и отбор соединений, перспективных для тестирования на антибактериальную активность.

1. Материалы и методы

Для проведения виртуального скрининга потенциальных ингибиторов белка KasA микобактерии M.tuberculosis использовали виртуальную молекулярную библиотеку, которая содержала 28 860 химических соединений из баз данных DrugBank (https://go.drugbank.com/), ZINC15 (https://zinc.docking.org/) и Selleck Chemicals (https://www.selleckchem.com/). Молекулярный докинг этих соединений с активным центром фермента KasA проводили с помощью программы AutoDock Vina (https://vina.scripps.edu) в приближении жесткого рецептора и гибких лигандов. Структуру белка выделяли из его комплекса с ингибитором TLM5 [2] (ID PDB: 4C72). Ячейка для докинга включала область интерфейса TLM5/KasA и имела следующие параметры: $\Delta X = 20{,}67$ Å, $\Delta Y = 24{,}8$ Å, $\Delta Z = 16{,}46$ Å с центром при $X = -7.24$ Å, $Y = -19.9$ Å, $Z = 6.75$ Å. Параметр, характеризующий полноту поиска (охват конформационного пространства), был задан равным 100 (https://vina.scripps.edu). Значения свободной энергии образования комплексов лиганд/KasA рассчитывали с помощью оценочных функций AutoDock Vina (https://vina.scripps.edu), RF-Score-4 (https://pjballester.wordpress.com/software/) и NNScore 2.0 NNScore 2.0 (https://git.durrantlab.pitt.edu/jdurrant/nnscore2), а затем для каждого соединения вычисляли величину ECR. Комплексы соединений с белком KasA, имеющих высокие значения ECR, исследовали методом молекулярной динамики.

Классическую динамику комплексов лиганд/KasA в воде выполняли с помощью программного пакета Amber18 с использованием силового поля Amber ff14SB (https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf). После настройки системы атомы остова белка фиксировали дополнительным гармоническим потенциалом с силовой константой 2,0 ккал/моль/$Å^2$ и систему подвергали уравновешиванию с помощью модуля Sander программы Amber18 (https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf). Уравновешивание проводили в четыре последовательных этапа: 1) минимизация энергии с использованием 5000 шагов алгоритма наискорейшего спуска, за которыми следовали 5000 шагов алгоритма сопряженных градиентов; 2) систему постепенно нагревали от 0 К до 300 К в течение 50 пс в ансамбле NVT с использованием термостата Ланжевена с частотой столкновений 2,0 $пс^{-1}$; 3) уравновешивание давления осуществляли в течение 50 пс при давлении 1,0 атм. в ансамбле NPT с привлечением баростата Берендсена с характерным временем 2,0 пс; 4) ограничения на комплекс снимали и систему вновь уравновешивали при 300 К в течение 0,5 нс при постоянном давлении. После достижения равновесия проводили молекулярную динамику в течение 200 нс в ансамбле NPT при температуре T = 300 K и давлении P = 1,0 атм. Анализ молекулярно-динамических траекторий выполняли для последних 80 нс с помощью модуля CPPTRAJ программы Amber18 (https://ambermd.org/doc12/Amber18.pdf).

Во всех расчетах в качестве положительного контроля использовали аналог тиолактомицина (TLM) TLM5 – один из самых перспективных ингибиторов микобактерии M.tuberculosis, блокирующих каталитический сайт белка KasA [3].

2. Результаты о обсуждение

Анализ статических моделей комплексов лиганд/белок показывает, что 6 соединений с лучшими значениями ECR согласно данным молекулярного докинга проявляют высокое сродство к ферменту и характеризуются более низкими значениями свободной энергии связывания по сравнению с ингибитором TLM5. Кроме того, эти соединения образуют широкую сеть межмолекулярных контактов с функционально важными остатками каталитического сайта фермента KasA, которые обеспечиваются главным образом множественными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями, водородными связями, π-π-стэкингом и солевыми мостиками. При этом основной вклад в энергетическую стабилизацию комплексов лиганд/KasA вносят ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Молекулярно-динамические расчеты подтверждают эти выводы: анализируемые комплексы стабильны на МД траекториях, о чем свиде-

тельствуют средние значения свободных энергий связывания и соответствующие значения стандартной ошибки среднего (рис. 1).

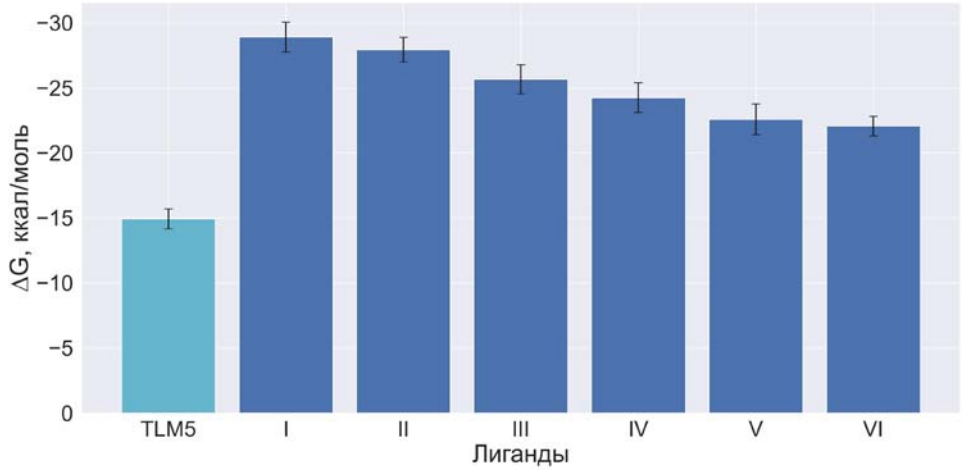

Рисунок 1 – Средние значения свободной энергии связывания ΔG, рассчитанные для идентифицированных соединений и ингибитора TLM5, связанных с белком KasA. Значения стандартной ошибки среднего (ΔG_{SEM}) обозначены вертикальными линиями

Анализ рис. 1 показывает, что эти средние значения значительно ниже величины, полученной с использованием идентичного вычислительного протокола для ингибитора M.tuberculosis TLM5. Относительную стабильность комплексов лиганд/KasA подтверждают данные о временных зависимостях среднеквадратичных отклонений (RMSD, Root-Mean-Square Deviation) положений атомов между всеми МД структурами комплексов лиганд/KasA и их исходными моделями (рис. 2). Как видно из рисунка 2, анализируемые комплексы не претерпевают существенных структурных изменений на МД траекториях, что подтверждается средними значениями RMSD, рассчитанными для динамических моделей идентифицированных соединений, связанных с белком KasA. Эти средние значения, равные 1,28 ± 0,12 Å (соединение I), 1,06 ± 0,08Å (соединение II), 1,30 ± 0,09Å (соединение III), 1,14 ± 0,09 Å (соединение IV), 1,11 ± 0,07 Å (соединение V) и 1,12 ± 0,08 (соединение VI)Å , очень близки к величине 1,13 ± 0,10 Å, рассчитанной для ингибитора TLM5 (рис. 2).

Расчет среднеквадратичных флуктуаций (RMSF, Root Mean Square Fluctuation) отдельных остатков KasA, указывающих на гибкость каждой аминокислоты во время МД моделирования, показывает, что большинство остатков фермента пространственно ограничены. Анализ величин RMSF указывает на небольшие структурные колебания остатков KasA как в комплексах с соответствующими соединениями, так и в несвязанной форме.

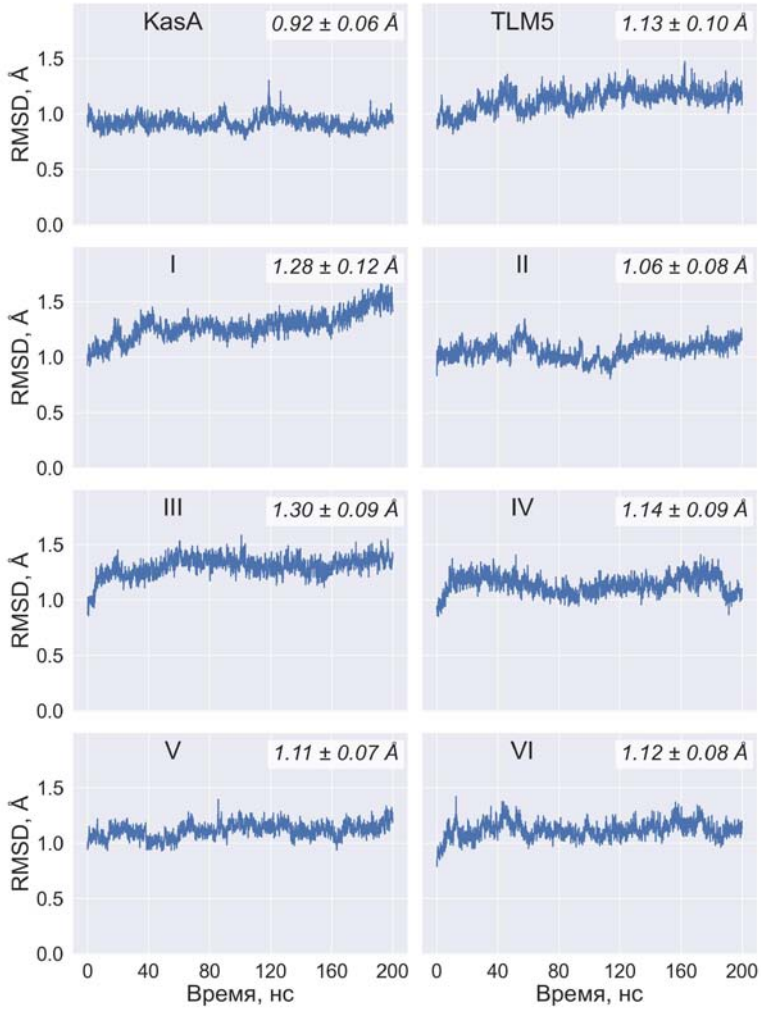

Рисунок 2 – Зависимость от времени значений RMSD (Å), рассчитанных между всеми структурами MD и исходными моделями комплексов лиганд/KasA. В расчетах использовались атомы основной цепи KasA. В правом верхнем углу указаны средние значения СКО и соответствующие стандартные отклонения

Основные флуктуации наблюдаются на сегментах, расположенных за пределами каталитического сайта белка KasA. Средние значения RMSF для комплексов лиганд/KasA и белка в свободном состоянии примерно одинаковы и находятся в диапазоне от 0,53 до 0,60 Å. Важно отметить, что аминокислотные остатки KasA, расположенные в активном центре фермента, также пространственно ограничены, включая аминокислоты, которые преобладают в интерфейсе лиганд/KasA. Для этих критически важных остатков значения RMSF не превышают 1,0 Å. Эти данные свидетельствуют о том, что ключевые остатки фермента демонстрируют небольшие внутренние движения, способствуя тому, чтобы рассматриваемые соединения могли блокировать каталитический сайт KasA.

Заключение

Данные молекулярного моделирования показывают, что идентифицированные в результате виртуального скрининга соединения могут эффективно блокировать активный центр фермента KasA путем многочисленных ван-дер-ваальсовых контактов, водородных связей, специфических π-π-взаимодействий и солевых мостиков. Эффективность межмолекулярных взаимодействий в комплексах лиганд/KasA подтверждают низкие значения свободной энергии связывания, что указывает на высокое сродство идентифицированных молекул с областью белка KasA, критически важной для биосинтеза компонентов клеточной стенки микобактерии M.tuberculosis. Таким образом, данные молекулярного моделирования свидетельствуют о том, что идентифицированные молекулы представляют значительный интерес для проведения дальнейших экспериментальных и теоретических исследований. Эти исследования включают химический синтез соединений, биомедицинские испытания *in vitro* и оптимизацию структуры соединения-лидера, направленную на получение его аналогов с улучшенной антибактериальной активностью и приемлемыми фармакологическими свойствами.

Работа выполнена при поддержке Консорциума и Программы по разработке портала по лекарственно устойчивому туберкулезу [4] (https://tbportals.niaid.nih.gov).

Библиографические ссылки

1. Palacio-Rodríguez K., Lans I., Cavasotto C. N., Cossio P. Exponential Consensus Ranking Improves the Outcome in Docking and Receptor Ensemble Docking // Sci. Rep. 2019. № 9(1). Article 1.
2. Luckner S.R., Machutta C.A., Tonge P.J., Kisker C. Crystal Structures of Mycobacterium Tuberculosis KasA Show Mode of Action Within Cell Wall Biosynthesis and Its Inhibition by Thiolactomycin // Structure. 2009. № 17(7). P. 1004–1013.
3. Machutta C.A., Bommineni G.R., Luckner S.R. et al. Slow Onset Inhibition of Bacterial Beta-Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthases by Thiolactomycin // J. Biol. Chem. 2010. № 285(9). P. 6161–6169.
4. Rosenthal A., Gabrielian A., Engle E, et. al. The TB Portals: an Open-Access, Web-Based Platform for Global Drug-Resistant-Tuberculosis Data Sharing and Analysis // Journal of Clinical Microbiology, 2017. № 77(1). P. 3261–3282. //doi.org/10.1128/JCM.01013-17.