

**ВАЛИДАЦИЯ МОДЕЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ГРУППЫ
АЦИЛТРАНСФЕРАЗ В ПОИСКЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА
МИКОЛОВЫХ КИСЛОТ**

Лахвич Ф. Ф./

*Кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
lakhvichtt@gmail.com*

Ринейская О. Н.

*Кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биоорганической химии Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск
ryneiskaya@mail.ru*

Аннотация. Целью исследования явилась сравнительная оценка эффективности связывания Ривароксабана с β -кетацил[АСР]синтазами I и III *in silico*. При помощи методов молекулярного докинга и компьютерных средств визуализации были определены параметры и топология комплексов Ривароксабана с мутантными β -кетацил[АСР]синтазой I (Cys171Gln) и β -кетацил[АСР]синтазой III (Cys112Ala), которые имитируют открытую конформацию соответствующих ферментов, участвующих в синтезе миколовых кислот. Рекомендуется использовать данные модели в качестве мишеней для последующих экспериментов *in silico* по поиску новых ингибиторов биосинтеза жирных кислот микобактерий и изучению механизма их действия.

Ключевые слова: аффинность; β -кетацил[АСР]синтаза I; β -кетацил[АСР]синтаза III; миколовые кислоты; молекулярный докинг; Ривароксабан

**VALIDATION OF ACYLTRANSFERASE MODEL TARGETS FOR THE
DEVELOPMENT OF THE MYCOLIC ACID BIOSYNTHESIS INHIBITORS**

Lakhvich T. T.

*Ph.D. in Chemistry, Associate Professor of Bioorganic Chemistry Department
of Belarusian State Medical University, Minsk
lakhvichtt@gmail.com*

Ryneiskaya V. M.

*Ph.D. in Medicine, Head of Bioorganic Chemistry Department of Belarusian
State Medical University, Minsk*

Summary. The research objective was to estimate the efficiency of binding Rivaroxaban to β -ketoacyl[ACP]synthase I and III in silico. Using molecular docking methods and computer visualization tools, the parameters as well as topology of Rivaroxaban complexes with mutant β -ketoacyl[ACP]synthase I (Cys171Gln) and β -ketoacyl[ACP]synthase III (Cys112Ala) were determined, the latter mimic the open conformation of the corresponding enzymes involved in the synthesis of mycolic acids. It is recommended to use these models as targets for subsequent in silico experiments to search for new inhibitors of mycobacterial fatty acid biosynthesis and to study their mechanism of action.

Keywords: affinity, β -ketoacyl[ACP]synthase III; β -ketoacyl[ACP]synthase I; molecular docking; mycolic acids; Rivaroxaban

Среди наиболее популярных мишеней в поиске и разработке новых лекарственных средств (ЛС) можно выделить компоненты клеточной стенки микобактерий, которые включают пептидогликан, арабиногалактан и миколовые кислоты [1]. В миколовых кислотах, специфичных для микобактерий, длинная меромиколатная цепь (C_{42} – C_{62}) имеет разветвление в α -положении (насыщенный фрагмент C_{24} – C_{26}) и содержит в β -положении гидроксильную группу, которая обеспечивает связывание с арабиногалактаном. Формирование такой специфической структуры протекает через ряд стадий в присутствии представителей семейств ацилтрансфераз, редуктаз, дегидратаз, поликетидсинтаз и др [2].

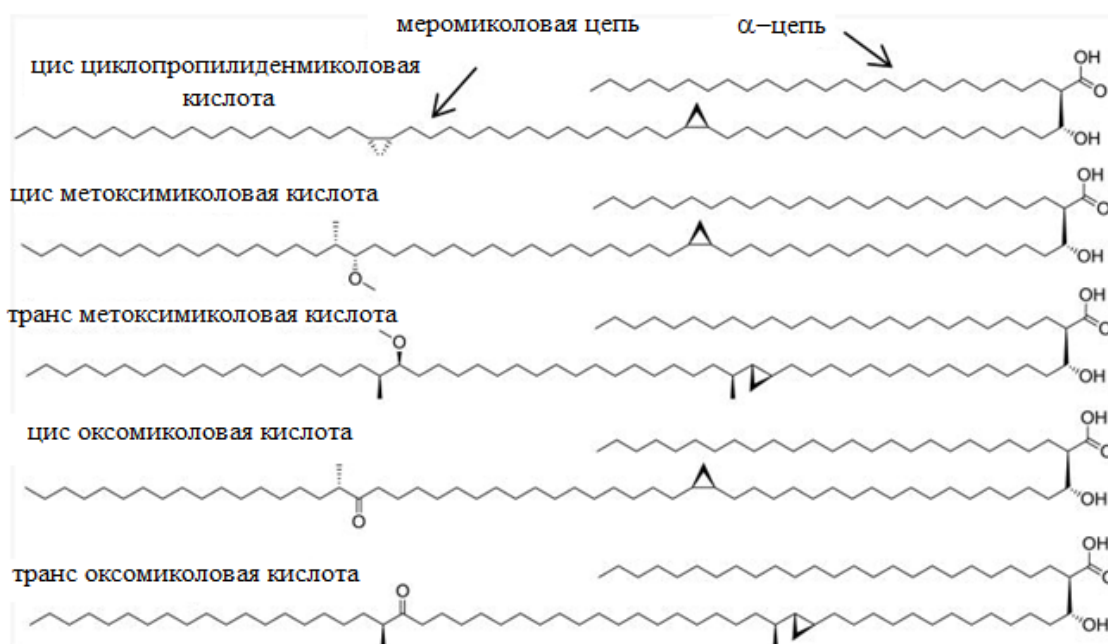


Рисунок 1 – Классификация и строение миколовых кислот

Среди эссенциальных для биосинтеза миколовых кислот ацилтрансфераз в качестве перспективных биологических мишеней выделяют β -кетоацил[ACP]синтазы I и III (или KAS I и KAS III соответственно), которые катализируют ключевые стадии синтеза меромиколовых кислот.

Ранее нами в экспериментах *in silico* [3-7] и *in vitro* [4,7] была изучена активность различных классов соединений (производных изонипекотиновых кислот, альдонамидов, оксазолидинонов) по отношению к KAS I и KAS III. Нами было высказано предположение [6], что мутантные варианты нативных ферментов, моделирующих открытую конформацию β -кетосинтаз, позволяют более эффективно проводить скрининг соединений в поиске лидера.

Цель работы - валидация мутантных вариантов β -кетоацил[ACP]синтазы I (Cys171Gln) и β -кетоацил[ACP]синтазы III (Cys112Ala) в качестве модельных мишеней в поиске новых ингибиторов синтеза миколовых кислот.

Материалы и методы. Информация о трехмерной структуре мутантных вариантов β -кетоацил[ACP]синтазы I (Cys112Ala; 2WGF, цепь A), далее KASI(Cys171Ala); β -кетоацил[ACP]синтазы III (Cys112Ala; 1U6E, цепь A), далее KAS III(Cys112Ala), получена с сайта <https://www.rcsb.org>.

Для молекулярного докинга *in silico* и визуализации полученных комплексов использовали ряд специализированных программ: программный пакет ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, Pymol, OpenBabelGUI, онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (<https://proteins.plus>).

В Autodock применяли генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 100, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. Лиганд - (S)-5-хлор-N-((2-оксо-3-(4-(3-оксоморфолино)фенил)оксазолидин-5-ил)метил)тиофен-2-карбоксамид (МНН Ривароксабан). Взаимодействие лиганда и протеина оценивали по энергии связывания ($E_{\text{связ.}}$), под которой в данной работе подразумевается наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса (ккал/моль) при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное.

Результат. Мутантные варианты ферментов KASI(Cys171Ala) и KAS III(Cys112Ala) моделирует топологию открытой конформации, в которой фермент осуществляет ацилирование. Поскольку конечной целью нашего исследования является валидация моделей для скрининга кандидатов-ингибитора β -кетоацилсинтаз, установление большего сродства лиганда к ферменту в открытой конформации может прогнозировать противотуберкулезную активность для большего числа кандидатов ЛС.

Рисунок 2 демонстрирует суперпозиции лигандов по отношению к каталитическим триадам, характерным для нативных ферментов: (Cys171Gln,

His311 и His345) для KAS I и (Cys112Ala, His244 и Asn274) для KAS III. Эксперимент *in silico* с мутантными вариантами фермента подтверждает наше предположение о том, что торможение Ривароксабаном роста микобактерий может быть связано с высокой аффинностью лиганда к активному центру β -кетоацилсинтаз I и III. В обоих случаях молекула лиганда занимает туннелеподобное пространство активного сайта мутантного фермента, соответствующего открытой конформации, находясь в непосредственной близости от каталитической триады. Поскольку мы рассматриваем потенциальное ингибирующее действие кандидата-ЛС, отсутствие взаимодействия с аминокислотами (АК) каталитической триады является закономерным; при этом наблюдаемая аффинность характеризуется низким значением энергии связывания: -10,26 и -10,19 ккал/моль для KAS I(Cys171Ala) и KAS III(Cys112Ala) соответственно.

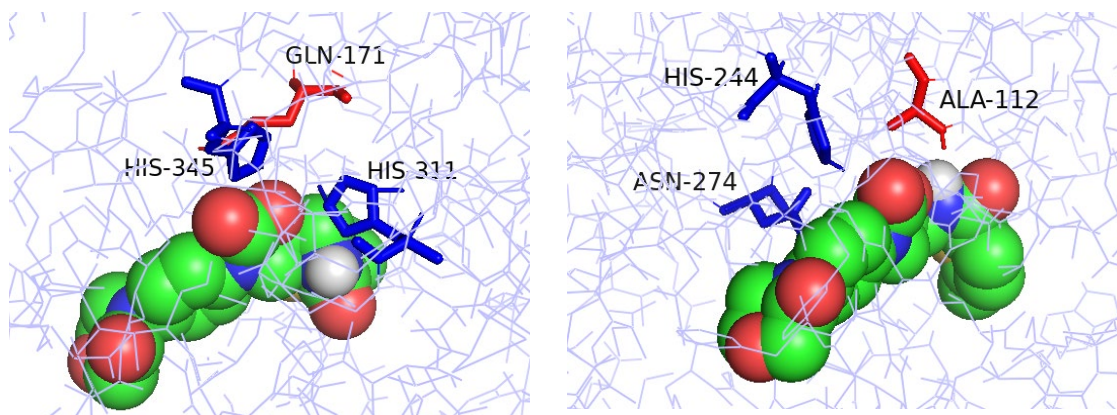


Рисунок 2 – Слева – комплекс Ривароксабан-KASI(Cys171Ala), справа – комплекс Ривароксабан-KASIII(Cys112Ala). Красным цветом выделены АК замены

Нами также были проанализированы типы взаимодействий, которые стабилизируют суперпозиции Ривароксабана по отношению к ферменту при образовании его комплексов с мутантными протеинами (рисунок 3).

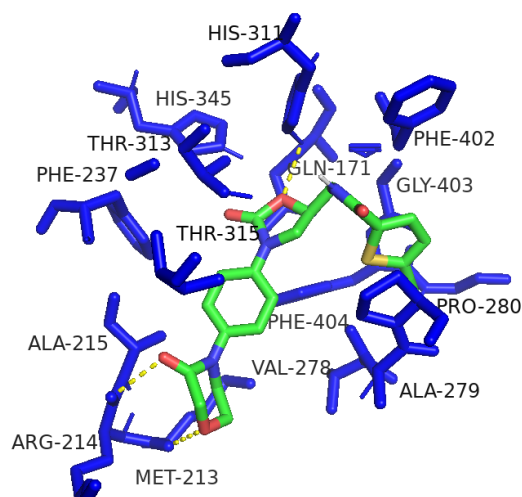


Рисунок 3 – АК окружение (в пределах 4 Å) молекулы Ривароксабана в комплексе с мутантами KAS I(Cys171Ala) слева и KAS III(Cys112Ala) справа

Для взаимодействия Ривароксабана с остатками АК протеинов, моделирующих открытую конформацию, исключительно важную роль играют гидрофобные взаимодействия. Так, для мутанта KAS III(Cys112Ala), фрагменты Leu142, Phe157, Ile189, Gln191, Trp195, Val205, Leu207, Val212, Phe213, Ala246, Ala306 (топологически можно выделить канал от Leu207 до Ala306) формируют протяженную гидрофобную матрицу, вдоль которой «вытягивается» молекула Ривароксабана с изгибом в области хлортиофенового кольца. Аналогичная топология была характерна для суперпозиции Ривароксабана в активном центре мутантного фермента, моделирующего открытую конформацию β -кетоацилсинтазы I, в которой молекула вытянута вдоль канала, образованного остатками гидрофобных фрагментов Ala215, Pro218, Phe402, Phe404. Гидрофильные взаимодействия лиганда с His311 для KASI(Cys171Gln) и с Ser276, Asn247 и Tyr304 для KAS III(Cys112Ala) стабилизируют ориентацию оксазолидинонового цикла. Дополнительно положение оксазинонового фрагмента в KASI(Cys171Gln) стабилизируется водородными связями с Arg214 и Met213, а ковшевидная конформация карбамоилхлортиофенового фрагмента KASIII(Cys112Ala) обеспечивается взаимодействием с Asn81 и Ala112. Вытянутая структура лиганда способствует образованию нескольких водородных связей со всеми гетероциклическими фрагментами. Можно предположить, что конкретная позиция лиганда в пределах данных карманов может меняться в рамках реализации одного механизма, обеспечивающего физиологический отклик, а также, что незначительные изменения характеристик среды (рН, присутствие ионов и пр.) приведут к переходу от энергетически и статистически доминирующих кластеров к минорным; при этом может изменяться физиологический отклик. Последнее предположение требует экспериментальной валидации в последующих экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Заключение. В результате исследования проведена валидация выбранных по результатам предыдущих исследований двух мутантных β -кетоацилсинтаз, которые участвуют в разных этапах биосинтеза миколовых кислот микобактерий. KASI(Cys171Ala) и KASIII(Cys112Ala) являются перспективными модельными мишенями для скрининговых исследований по поиску новых ингибиторов синтеза миколовых кислот.

Список литературы

1. Abrahams, K. Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. / K. Abrahams // Parasitology. – 2018. – V.145, N2. – P. 116-133.
2. North, E.J. New approaches to target the mycolic acid biosynthesis pathway for the development of tuberculosis therapeutics. / E.J. North, M. Jackson, R.E. Lee // Curr Pharm Des. – 2014 – V. 20, N27. P. 4357-78.
3. Лахвич, Ф. Ф. Исследование сродства альдонамидов к рецепторам KASA в контексте разработки противотуберкулезных препаратов / Ф. Ф. Лахвич, М.И. Борова // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сборник научных трудов / Минск: БГМУ, 2021. - Вып. 11. С. 518-523.
4. Получение и сравнительное изучение биологической активности производных гидроксиизонипекотиновых кислот *in vitro* и *in silico*: разработка модели молекулярного докинга в поиске новых противотуберкулезных средств / Ф. Ф. Лахвич и соавт. // Вестник Мозырского государственного педагогического университета им. И.П. Шамякина. – 2018. – № 1(51). – С. 36-43.
5. Ринейская, О.Н. *In silico* исследование аффинности ривароксбана к β -кетоацил[АСР]синтазе 3 / О.Н. Ринейская, Ф.Ф. Лахвич // Физико-химическая биология как основа современной медицины. – Мн.: БГМУ, 2022. – С. 279-284.
6. Лахвіч, Т.Т. Афіннасьць Рывараксабану *in silico* да β -кэтаацыл[АСР] сінтазы I: пошук новага фармакафора / Т.Т. Лахвіч, В.М. Рынейская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2023. – Т. 59, № 1. С. 42–48.
7. Исследование противотуберкулезной активности ривароксбана *in silico* и *in vitro* / Ф. Ф. Лахвич [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2023. – Т. 67, № 3. – С. 207–213.