

УДК 547.787:615.281.873

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОПОЛОГИИ СВЯЗЫВАНИЯ РИВАРОКСАБАНА С МУТАНТНЫМИ ВАРИАНТАМИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ В-КЕТОАЦИЛ[АСР]СИНТАЗЫ III

Лахвич Ф. Ф., Ринейская О. Н.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

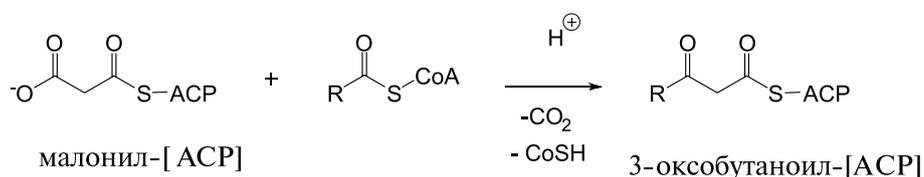
**Реферат.** Целью исследования явился сравнительный анализ топологии связывания Ривароксабана с мутантными (Cys112Ala и Ala246Phe) β-кетоацил[АСР]синтазами III. При помощи методов молекулярного докинга установлены центры связывания Ривароксабана с протеинами. Установлена высокая аффинность Ривароксабана к мутантному протеину Cys112Ala, моделирующего открытую конформацию кетоацил[АСР]синтазы III, который и рекомендуется в качестве стандарта для последующих экспериментов по поиску новых ингибиторов биосинтеза жирных кислот микобактерий и изучению механизма их действия.

**Ключевые слова:** аффинность, β-кетоацил[АСР]синтаза III, молекулярный докинг, Ривароксабан.

**Введение.** Рациональный драг-дизайн потенциальных лекарственных средств (ЛС), которые будут использоваться для лечения резистентных форм туберкулеза представляет собой актуальную и практически значимую проблему здравоохранения [1]. Поиск биологических мишеней, специфичных для микобактериальной клетки, является одним из перспективных направлений создания новых противотуберкулезных ЛС. К таким биологическим мишеням относятся ферменты синтаз жирных кислот (FAS), которые участвуют в биосинтезе компонентов клеточной стенки *Mycobacterium tuberculosis* и при этом отсутствуют в организме млекопитающих.

Ранее нами в экспериментах *in silico* [2–6] и *in vitro* [6] была изучена активность различных классов соединений (производных изонипекотиновых кислот, альдонамидов, оксазолидинонов) по отношению к β-кетоацил[АСР]синтазе I, которая участвует в синтезе миколовых кислот. В настоящем исследовании мы изучили аффинность производного оксазолидинона по отношению к β-кетоацил[АСР]синтазе III.

Фермент отвечает за инициирование биосинтеза жирных кислот с помощью диссоциированной (FAS II) системы биосинтеза жирных кислот, которая встречается в растениях и бактериях и отсутствует в клетках млекопитающих [7] (рисунок 1).



**Рисунок 1** — Схема реакции конденсации ацетил коэнзима А и малонил-[АСР] с последующим декарбоксилированием ([АСР] — ацилпереносящий белок)

При этом в качестве субстрата преимущественно используются тиоэфир ацил-СоА с короткой цепью (предпочтительно ацетил-СоА). Таким образом, данный фермент играет ключевую роль в синтезе микро-

ловых кислот, так как катализирует первую реакцию конденсации, иницируя синтез жирных кислот и поэтому может играть роль в регуляции процесса образования длинно-цепочечных миколовых кислот в целом.

**Цель работы** — изучение аффинности и характера взаимодействий Ривароксабана по отношению к мутантным  $\beta$ -кетоацил[ACP] синтазам III, в которых проведена аминокислотная замена Cys112Ala и Ala246Phe, для выбора модели биологической мишени в поиске новых противотуберкулезных средств.

**Материалы и методы.** Информация о трехмерной структуре нативного (1HZR, цепь A), мутантного варианта по Cys112Ala (1U6E, цепь A) и мутантного по Ala246Phe (2QO0, цепь A) фермента  $\beta$ -кетоацил[ACP] синтазы III получена с сайта Protein Data Bank (URL: <https://www.rcsb.org>).

Для молекулярного докинга *in silico* использовался ряд специализированных программ: программный пакет ChemOffice, AutoDock Tools 1.5.7, PyMol, OpenBabelGUI,

онлайн-серверы Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (URL: <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) и Protein-Plus (URL: <https://proteins.plus>).

AutoDock 4 использовался для подготовки лиганда к стыковке с рецептором, расчета сетки потенциалов и непосредственно лиганд-белковых взаимодействий. При стыковке с целью оптимизации процесса в Autodock применялся генетический алгоритм поиска глобального минимума Ламарка (LGA) с числом прогонов 100, размером популяции 300 для жесткого рецептора и гибкого лиганда. В качестве лиганда исследовали молекулу (S)-5-хлор-N-((2-оксо-3-(4-(3-оксоморфолино)фенил)оксазолидин-5-ил)метил)тиофен-2-карбоксамид (МНН Ривароксабан) (рисунок 2).

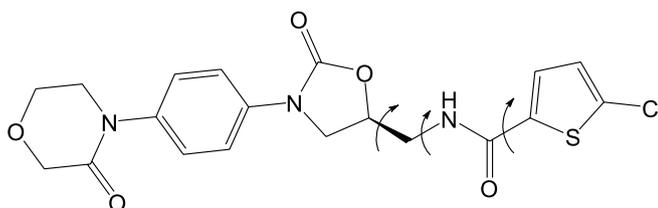


Рисунок 2 — Связи в Ривароксабране, относительно которых возможно вращение

Взаимодействие лиганда и белка оценивалось при помощи характеристики, полученной в результате молекулярного докинга: энергии связывания ( $E_{\text{связ.}}$ ). В настоящей работе энергией связывания считали наименьшее значение изменения свободной энергии Гиббса (ккал/моль) при переходе комплекса лиганд-протеин из несвязанного состояния в связанное. Программа OpenBabelGUI использовалась в качестве конвертера форматов, требуемых AutoDock 4, PLIP и Protein-Plus. Поиск и анализ центров связывания, изучение характера взаимодействий лиганда с рецептором производился при помощи программы PyMOL, онлайн-серверов PLIP и Protein-Plus.

**Результаты и их обсуждение.** Ривароксабан используется в качестве антикоагулянта, реализующего свой эффект через ингибирование фактора свертываемости крови Ха. Нами было показано, что Ривароксабан имеет высокую аффинность по отношению к кетоацилсинтазе I; в опытах *in vitro* раствор фармсубстанции данного ЛС в ДМСО ингибировал развитие клеток культуры *Micobacterium Terrae* [6].

В данном исследовании мы определили аффинность Ривароксабана к мутантным вариантам кетоацилсинтазы III, в которых были проведены аминокислотные (АК) замены: в первом протеине Cys112 на Ala, а во втором — Ala246 на Phe.

Чтобы определить, является ли  $\beta$ -кетоацил[ACP]синтаза III мишенью Ривароксабана, нами первоначально был проведен докинг нативного протеина (код 1HZR) и лиганда (рисунок 3). Наименьшая энергия связывания составила  $-8,65$  ккал/моль, что с учетом размеров молекулы Ривароксабана является относительно невысоким значением и, следовательно, не может подтверждать участие изучаемого фермента в процессе ингибирования роста микобактерий. С учетом выдвинутой ранее гипотезы о наличии у протеина закрытой и открытой конформаций, последняя из которых отвечает за транспорт лиганда в область активного сайта фермента [8], нами был проведен докинг с мутантными вариантами фермента. Мутант Cys112Ala моделирует топологию открытой конформации. Во втором случае замена Ala246 на Phe ими-

тирует закрытую конформацию. Поскольку конечной целью нашего исследования является разработка именно ингибитора  $\beta$ -кетоацилсинтазы, установление большего сродства лиганда к ферменту в открытой конформации может прогнозировать высокую противотуберкулезную активность для большего числа кандидатов ЛС.

Рисунок демонстрирует различные суперпозиции лиганда по отношению к каталитической триаде фермента (Cys112, His244 и Asn274) [8] в его открытой и закрытой конформациях. 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  $\beta$ -кетоацилсинтазы III. Так, 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 АК каталитической триады является закономерным. При этом наблюдаемая аффинность характеризуется высоким значением энергии связывания  $-10,19$  ккал/моль. В то же время суперпозиция лиганда по отношению к инактивированному мутантному ферменту (согласно научным данным в Ala246Phe пантетеинатный связывающий канал заблокирован [8]), характеризуется относительно низкой аффинностью и расположением во внешней сфере вне пределов активного сайта ( $-8,68$  ккал/моль).

Нами также были проанализированы типы взаимодействий, которые стабилизируют суперпозиции Ривароксабана при образовании его комплексов с мутантными протеинами (таблица, рисунок 4)

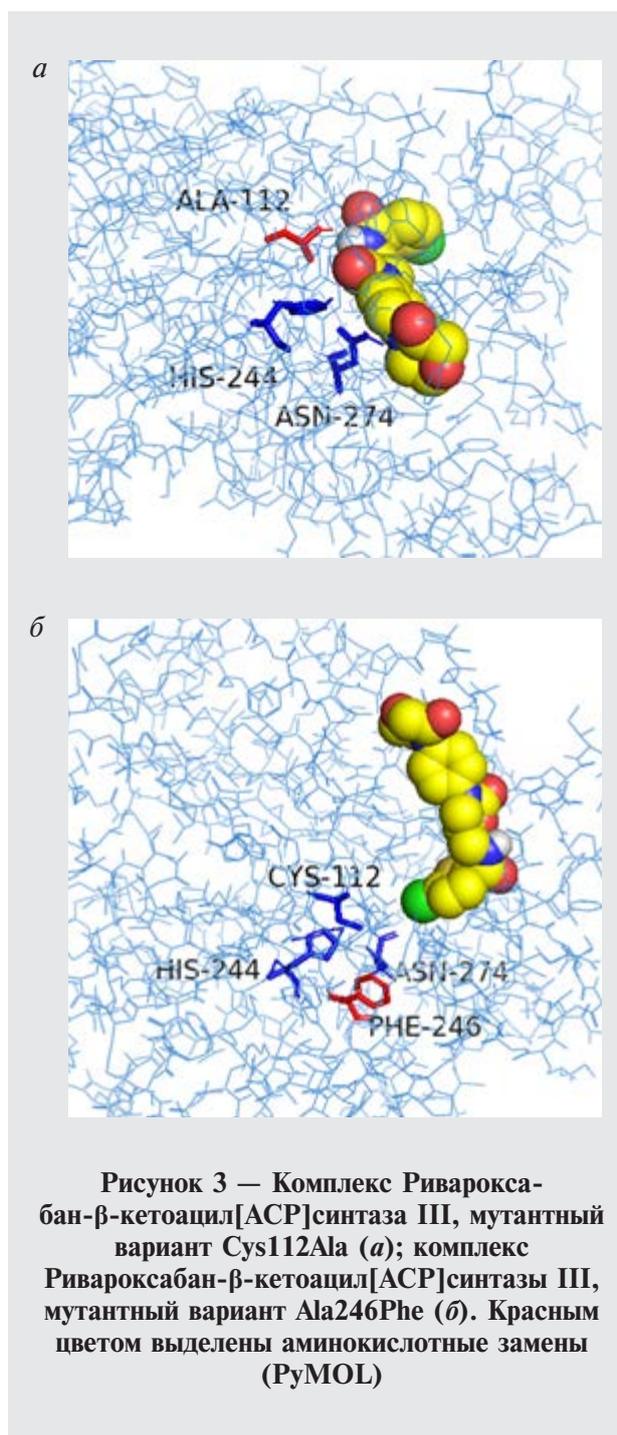


Рисунок 3 — Комплекс Ривароксабан- $\beta$ -кетоацил[АСР]синтаза III, мутантный вариант Cys112Ala (а); комплекс Ривароксабан- $\beta$ -кетоацил[АСР]синтазы III, мутантный вариант Ala246Phe (б). Красным цветом выделены аминокислотные замены (PyMOL)

Таблица — Показатели, характеризующие взаимодействия атомов Ривароксабана и аминокислот протеина комплексов мутантных вариантов

AA	Тип взаимодействия	Межатомное расстояние, Å	
		Cys112Ala	Ala246Phe
81 Asn	Водородная связь	2,88–4,04*	—
112 Ala	Водородная связь	3,38–4,04	—
142 Leu	Гидрофобное	—	3,69
157 Phe	Гидрофобное	3,26	3,94

Окончание таблицы

АА	Тип взаимодействия	Межатомное расстояние, Е	
		Cys112Ala	Ala246Phe
189 Ile	Гидрофобное	3,59	—
191 Gln	Водородная связь	—	2,06–2,77
195 Trp	Водородная связь	—	2,43–2,90
205 Val	Гидрофобное	3,76	3,34
207 Leu	Гидрофобное	3,40	—
212 Val	Гидрофобное	3,42	—
213 Phe	Водородная связь	2,65–3,20	—
246 Ala	Гидрофобное	3,22	—
247 Asn	Водородная связь	3,25–3,57	—
276 Ser	Водородная связь	2,20–2,72	—
304 Tyr	Водородная связь	2,90–3,69	—
306 Ala	Гидрофобное	3,72	—

\* Для водородной связи расстояние — атом-Н — атом-донор электронов.

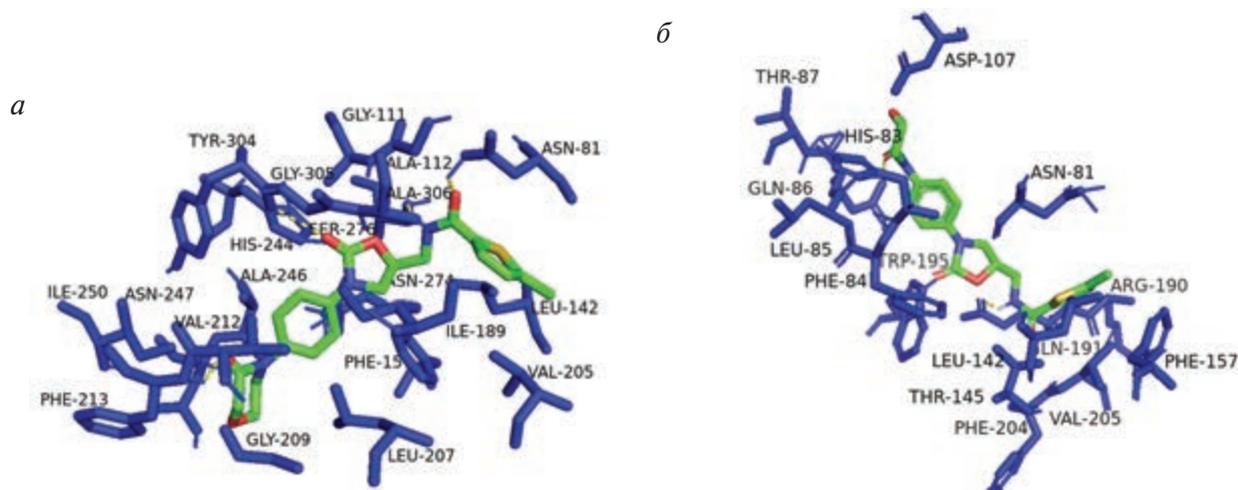


Рисунок 4 — Аминокислотное окружение (в пределах 4 Е) молекулы Ривароксабана в комплексе с мутантом Cys112Ala слева и Ala246Phe в комплексе с мутантом справа (РyMOL)

Для взаимодействия Ривароксабана с АК остатками протеина, моделирующего открытую конформацию, исключительно важную роль играют гидрофобные взаимодействия (см. таблицу, рисунок 4). Так, 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 гидрофобной матрицы была характерна и для суперпозиции Ривароксабана в активном центре мутантного фермента, моделирующего от-

крытую конформацию кетоацилсинтазы I [5]. Влияние гидрофильного взаимодействия лиганда с Asn81 и Ala112 носит вспомогательный характер, обеспечивая ориентацию хлортиофенового фрагмента в виде ковшевидной конформации. Аналогично образование водородных связей с Ser276, Asn247 и Tyr304 стабилизирует ориентацию оксазолидинового цикла, а с Phe213 — оксазинонового фрагмента Ривароксабана. Образование нескольких водородных связей со всеми гетероциклическими фрагментами Ривароксабана обеспечивается вытянутой структурой лиганда. Можно предположить, что конкретная позиция лиганда в пределах данного кармана может меняться в рамках реали-

зации одного механизма, обеспечивающего физиологический отклик. При этом можно предположить, что незначительные изменения характеристик среды (например, рН, присутствие ионов и пр.) приведут к переходу от энергетически и статистически доминирующих кластеров к минорным кластерам. При этом может происходить изменение физиологического отклика. Последнее предположение требует экспериментальной валидации в дальнейших экспериментах *in vitro*.

Поскольку молекула Ривароксабана находится близко к внешней сфере мутантного протеина, моделирующего закрытую конформацию, количество взаимодействий резко сокращается, что приводит к уменьшению аффинности к рецептору. Поскольку лиганд находится далеко от активного сайта и каталитической триады, обсуждение характера его взаимодействия с АК остатками представляется нецелесообразным.

**Заключение.** Проведенные ранее испытания показали антимикобактериальную активность Ривароксабана *in vitro* [6]. Поэтому

результаты нашего исследования с большой степенью вероятности подтверждают реализацию механизма антибактериального действия через ингибирование синтеза миколовых кислот. С учетом проведенных ранее исследований можно предполагать возможность реализации ингибирования роста микобактериальных клеток на различных этапах биосинтеза жирных кислот с участием различных кетоацилсинтаз. При этом, исходя из результатов данного и предыдущего [5] экспериментов, в котором Ривароксабан показал наиболее высокую аффинность в активном центре именно к мутантным вариантам ферментов, моделирующих открытую конформацию  $\beta$ -кетоацилсинтаз I и III, мы предлагаем использовать модели Cys171Gln для  $\beta$ -кетоацил[ACP]синтазы I и Cys112Ala для  $\beta$ -кетоацил[ACP]синтазы III соответственно в дальнейших исследованиях по поиску новых противотуберкулезных ЛС, а также изучению дополнительной антимикобактериальной активности используемых в клинике ЛС, и в частности, из группы ксабанов.

### Список цитированных источников

1. Clinical outcome of individualized treatment of multidrug-resistant tuberculosis in Latvia: a retrospective cohort study / V. Leimane [et al.] // *Lancet*. — 2005. — Vol. 365 (9456). — P. 318–326.
2. 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 : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т. — Минск : БГМУ, 2021. — Вып. 11. — С. 518–523.
3. Получение и сравнительное изучение биологической активности производных гидроксизонипекотиновых кислот *in vitro* и *in silico*: разработка модели молекулярного докинга в поиске новых противотуберкулезных средств / Ф. Ф. Лахвич, Е. А. Булава, П. Ю. Зушик, А. А. Кульчик // *Вестн. Мозырского гос. пед. ун-та им. И. П. Шамякина*. — 2018. — № 1 (51). — С. 36–43.
4. Лахвич, Ф. Ф. Исследование *in silico* зависимости структура-активность оксазолидинонов в поиске противотуберкулезных лекарственных средств / Ф. Ф. Лахвич, М. И. Борова, О. Н. Рынейская // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. науч. тр. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т. — Минск : БГМУ, 2022. — Т. 2, вып. 12. — Минск : БГМУ, 2022. — С. 200–205.
5. Лахвич, Т. Т. Афіннасць Рывараксабану *in silico* да  $\beta$ -кэтаацыл[ACP] сінтазы I: пошук новага фармакафора / Т. Т. Лахвіч, В. М. Рынейская // *Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук*. — 2023. — Т. 59, № 1. — С. 42–48. DOI:10.29235/1561-8331-2023-59-1-42-48.
6. Исследование противотуберкулезной активности ривароксабана *in silico* и *in vitro* / Ф. Ф. Лахвич [и др.] // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. — 2023. — Т. 67, № 3. — С. 207–213. DOI:10.29235/1561-8323-2023-67-3-207-213.
7. Sachdeva, S. Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (mtFabH) assay: principles and method / S. Sachdeva, K.A. Reynolds // *Methods Mol Med*. — 2008. — Vol. 142. — P. 205–13. DOI: 10.1007/978-1-59745-246-5\_16.
8. Separate Entrance and Exit Portals for Ligand Traffic in Mycobacterium tuberculosis FabH / S. Sachdeva [et al.] // *Chemistry & Biology*. — 2008. — Vol. 15, № 4. — P. 402–412. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.03.007.



## Comparative analysis of the binding topology of Rivaroxaban complexes with mutant variants of mycobacterial $\beta$ -ketoacyl[ACP] synthase III

*Lakhvich T. T., Ryneiskaya O. N.,*

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Comparative analysis of the binding topology of Rivaroxaban complexes with mutant (Cys112Ala and Ala246Phe) variants of  $\beta$ -ketoacyl[ACP] synthases III has been carried out in silico. By means of molecular docking methods, the binding centers of Rivaroxaban with proteins have been found. The high affinity of Rivaroxaban for the mutant Cys112Ala variant of protein, which models the open conformation of ketoacyl[ACP]synthase III, was established. The further is recommended as a standard for follow-up experiments to search for new inhibitors of mycobacterial fatty acid biosynthesis and study the mechanism of their action.

**Keywords:** affinity,  $\beta$ -ketoacyl[ACP] synthase III, molecular docking, Rivaroxaban.

*Поступила 16.06.2023*