

УДК 577.152.22, 547-305.2

# Поиск ингибиторов транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis* в ряду сульфозамещенных соединений

И. В. Гуцина<sup>1\*</sup>, Д. К. Нилов<sup>2\*</sup>, Т. А. Щербакова<sup>2</sup>, С. М. Балдин<sup>2</sup>, В. К. Швядас<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

\*Авторы, внесшие равный вклад в представленную работу.

\*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступило в редакцию 18.02.2023

Принято к печати 12.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.15709

**РЕФЕРАТ** В результате компьютерного скрининга библиотеки сульфозамещенных соединений выявлены молекулы, способные связываться в активном центре транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis*. Осуществлена экспериментальная проверка ингибиторной активности наиболее перспективного соединения STK045765 в отношении высокоочищенного препарата рекомбинантного фермента. Показано, что молекула STK045765 конкурирует за участок связывания пирофосфатной группы кофактора тиаминдифосфата и в микромолярных концентрациях способна подавлять активность микобактериальной транскетолазы. Обнаруженный фурансульфонатный скаффолд может служить основой для создания противотуберкулезных препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** сульфонаты, сульфогруппа, ингибиторы, тиаминдифосфат, транскетолаза, микобактерии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** mbTK – транскетолаза микобактерий.

## ВВЕДЕНИЕ

Лечение туберкулеза основано на продолжительной многокомпонентной химиотерапии и зачастую сопровождается развитием лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим чрезвычайно актуален поиск новых молекулярных мишеней и разработка препаратов, способных селективно подавлять развитие микобактерий. Анализ генома штамма H37Rv *M. tuberculosis* позволил установить метаболические пути, подавление которых может служить основой для разработки новых лекарственных средств. В частности, важное значение имеет пентозофосфатный путь и связанный с ним фермент транскетолаза (mbTK) [1, 2]. mbTK катализирует обратимый перенос двухуглеродного фрагмента субстрата-донора (кетосахар) на субстрат-акцептор (альдоза). Один из субстратов mbTK, рибозо-5-фосфат, используется для синтеза клеточной стенки микобактерий [3, 4]. В настоящей работе мы осуществили компьютерный скрининг способности сульфозамещенных соединений связываться в активном центре mbTK и эксперименталь-

ную проверку ингибиторных свойств отобранного наиболее перспективного кандидата.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярная модель mbTK для докинга была получена на основе кристаллической структуры Zrim [4]. Атомы водорода добавляли с учетом ионизационных свойств аминокислотных остатков в программе AmberTools 1.2, затем их координаты оптимизировали в пакете Amber 12 [5] с использованием алгоритмов наискорейшего спуска и сопряженных градиентов. Библиотека сульфозамещенных соединений для скрининга была сконструирована на основе коммерческого набора низкомолекулярных соединений Vitas-M (<https://vitasmlab.biz>) с использованием структурного поиска по сульфогруппе в программе ACD/SpectrusDB (<https://www.acdlabs.com>). Соединения докировали в активный центр модели mbTK с помощью Lead Finder 1.1.16 [6]. Область поиска охватывала участок связывания кофактора тиаминдифосфата и субстрата [7]. При докировании отбирали соединения, способные

к образованию электростатического взаимодействия с ионом  $Mg^{2+}$  (для этого использовали Perl-скрипт структурной фильтрации), а также других благоприятных контактов.

Рекомбинантный белок mbTK получали с использованием плазмиды pET-19b с геном *Rv1449c* и штамма *Escherichia coli* BL21(DE3). Выделение и очистку белка проводили как описано ранее [8, 9]. Активность mbTK измеряли по сопряженной реакции восстановления  $NAD^+$ , катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика [10]. Система для измерения активности содержала: глицил-глицин (50 мМ), дитиотреитол (3.2 мМ), арсенат натрия (10 мМ), хлорид магния (2.5 мМ), тиаминдифосфат (5 мкМ), ксилулозо-5-фосфат (140 мкМ), рибозо-5-фосфат (560 мкМ),  $NAD^+$  (370 мкМ), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (3 Е) и разные концентрации ингибитора STK045765 (0–1000 мкМ). Реакцию начинали добавлением раствора апоформы mbTK в реакционную смесь, инкубируемую в термостатируемой ячейке при pH 7.6 и 25°C. Скорость реакции регистрировали по увеличению оптической плотности раствора при 340 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В активном центре mbTK располагается кофактор тиаминдифосфат, а также ион  $Mg^{2+}$  [4]. Взаимодействие пирофосфатной группы с  $Mg^{2+}$  вносит существенный вклад в энергию связывания тиаминдифосфата и имеет важное значение для дизайна ингибиторов транскетолаз, которые для mbTK до проведения наших исследований не были известны.

В качестве возможного структурного миметика пирофосфатной группы, способного образовать электростатическое взаимодействие с ионами металлов, была выбрана сульфогруппа. Из библиотеки коммерчески доступных низкомолекулярных веществ извлечено 320 молекул с концевой (отрицательно заряженной) сульфогруппой и 563 молекулы с этерифицированной сульфогруппой. В результате докинга определены позиции связывающихся соединений этого класса в активном центре mbTK; полученные результаты были подвергнуты структурной фильтрации, учитывающей наличие прямого электростатического взаимодействия сульфогруппы с  $Mg^{2+}$ . При экспертном анализе позиций отобранных соединений идентифицированы пять соединений с концевой сульфогруппой (рис. 1), эффективно взаимодействующих с  $Mg^{2+}$  и окружающими остатками активного центра mbTK. Менее эффективные взаимодействия этерифицированных сульфонатов

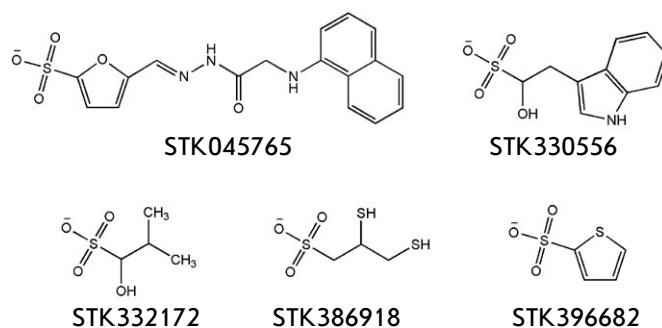


Рис. 1. Химические структуры потенциальных ингибиторов mbTK, отобранных в результате компьютерного скрининга

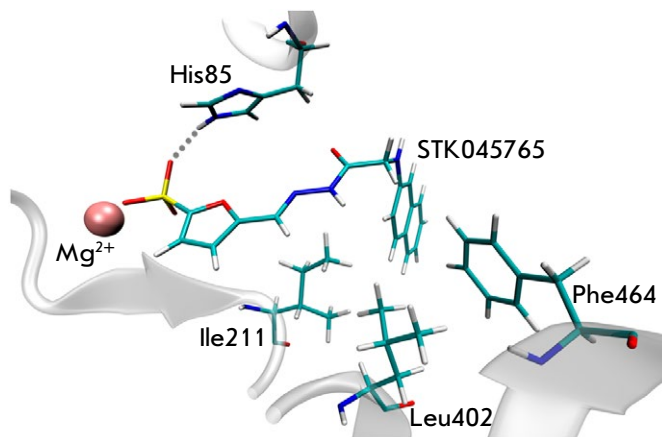


Рис. 2. Модель фермент-ингибиторного комплекса mbTK и STK045765. Сульфогруппа способна взаимодействовать с ионом  $Mg^{2+}$  и образовать водородную связь с остатком His85, гидрофобный бициклический структурный фрагмент комплементарен участку, сформированному остатками Ile211, Leu402 и Phe464. Рисунок подготовлен с использованием VMD 1.9.2 [11]

указывают на то, что для связывания ингибиторов в активном центре mbTK необходима отрицательно заряженная группа.

Для экспериментального тестирования ингибиторных свойств была отобрана молекула STK045765, образующая наиболее благоприятные связи и контакты при моделировании фермент-ингибиторных комплексов. В данной молекуле фурансульфонатный и нафталиновый фрагменты соединены гидразидным линкером. Отрицательно заряженная сульфогруппа STK045765 способна взаимодействовать с ионом  $Mg^{2+}$  и боковой цепью His85 (рис. 2) подобно пирофосфатной группе кофактора. Наряду с этим имеют место выгодные гидрофобные контакты бициклического структурного фрагмента STK045765 с боковыми цепями Ile211, Leu402 и Phe464. Экспериментальная проверка подтвердила

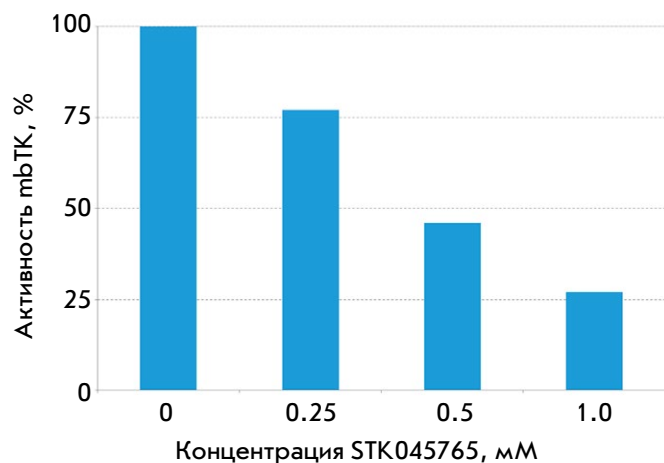


Рис. 3. Влияние ингибитора STK045765 на каталитическую активность mTAK

выводы молекулярного моделирования. При добавлении ингибитора в реакционную смесь обнаружено подавление активности mTAK: так в присутствии STK045765 в концентрации 1 мМ остаточная активность составила 27% (рис. 3).

## ВЫВОДЫ

Компьютерный скрининг библиотеки сульфозамещенных соединений позволил идентифицировать потенциальные ингибиторы, способные связываться в активном центре mTAK и конкурировать с кофактором тиаминдифосфатом. Экспериментальная проверка одного из кандидатов (STK045765, содержащего фурансульфонатную группу) в отношении высокоочищенного препарата mTAK подтвердила, что соединения данного класса способны подавлять ферментативную активность. В результате проведенного исследования обнаружен первый (в своем классе) ингибитор mTAK, структура которого может стать основой для разработки более эффективных ингибиторов – прототипов противотуберкулезных препаратов. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00069-П).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3<sup>rd</sup>, et al. // Nature. 1998. V. 393. P. 537–544.
2. Kolly G.S., Sala C., Vocat A., Cole S.T. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 358. P. 30–35.
3. Wolucka B.A. // FEBS J. 2008. V. 275. P. 2691–2711.
4. Fullam E., Pojer F., Bergfors T., Jones T.A., Cole S.T. // Open Biol. 2012. V. 2. P. 110026.
5. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., 3<sup>rd</sup>, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., et al. AMBER 12. San Francisco: University of California, 2012.
6. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
7. Lüdtke S., Neumann P., Erixon K.M., Leeper F., Kluger R., Ficner R., Tittmann K. // Nat. Chem. 2013. V. 5. P. 762–767.
8. Щербакова Т.А., Балдин С.М., Шумков М.С., Гущина И.В., Нилов Д.К., Швядас В.К. // Acta Naturae. 2022. Т. 14. № 2. С. 93–97.
9. Мешалкина Л.Е., Соловьева О.Н., Ходак Ю.А., Друца В.Л., Кочетов Г.А. // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 992–1000.
10. Kochetov G.A. // Methods Enzymol. 1982. V. 90. P. 209–223.
11. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33–38.