

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 ОСОБЛИВОСТЕЙ ЛІГАНД-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ
БАКТЕРІАЛЬНОГО ФЕРМЕНТУ DRPE1**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра
студента спеціальності 091 «Біологія»
ОП «Біологія (високі технології)»
Самойленко Вікторії Олександрівни

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

Оцінка захисту роботи

Робота виконана в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень №0120U104883 під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», к.б.н Самофалової Д.О.

Київ – 2022 р.

АНОТАЦІЯ

Самойленко В. О. Дослідження ліганд-білкових взаємодій бактеріального ферменту DRPE1. – Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

DRPE1 є ферментом, який каталізує реакції епімеризації декапреніл-фосфо-рибози, яка є компонентом клітинної стінки бактерій.

В ході дослідження було реконструйовано структуру DRPE1 для *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*. Досліджено ідентичність послідовностей для різних представників *Mycobacterium*, а також для послідовності людини. Було проаналізовано хімічні бази даних на пошук інгібуючих речовин. Було виконано ліганд-білковий докінг.

Бакалаврська робота викладена на 38 сторінках, ілюстрована 17 рисунками, 8 таблицями, 2 додатками. Список використаних джерел становить 26 робіт.

Ключові слова: DRPE1, ліганд, молекулярний докінг, інгібітори DRPE1, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК	УМОВНИХ
СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ	1. ОГЛЯД
ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Стан проблеми та її актуальність	6
1.2. Загальна характеристика епімераз.....	6
1.3. Класифікація та просторова структура DRPE1	10
1.4. Роль DRPE1 у клітині	11
1.5. Інгібітори DRPE1	12
РОЗДІЛ	2. МАТЕРІАЛИ ТА
МЕТОДИ	17
2.1. Структурне вирівнювання молекули DRPE1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> та споріднених видів	17
2.2. Реконструкція 3D-моделі DRPE1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> та <i>Mycobacterium bovis</i>	17
2.3. Верифікація побудованих моделей білків	18
2.4. Аналіз інгібіторів та їх активність	18
2.5. Підготовка структур DRPE1 та лігандів для докінгу	18
2.6. Докінг відібраних хітів	19
РОЗДІЛ	3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА
ОБГОВОРЕННЯ	20
3.1. Аналіз структури DRPE1 різних представників <i>Mycobacterium</i> та їх порівняння.....	20

3.2.	Реконструкція	просторової	структури	
DRPE1	22			
3.3.	Аналіз ліганд-білкових взаємодій			25
3.4.	Підготовка	структур	для	молекулярного
докінгу	26			
3.5.	Результати молекулярного докінгу			26
ВИСНОВКИ.....				31
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ				32
ДОДАТКИ.....				35

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ManNac – N-ацетилманнозамін.

UDP-GlcNAc – уридин-дифосфат-N-ацетилглюкозамін.

NAD⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид.

ЛПС – ліпополісахарид.

FAD – флавінаденіндинуклеотид.

DRP – декапреніл-фосфо-рибоза.

DRPE1 – декапренілфосфорил-бета-D-рибоза оксидаза.

DRPE2 – декапренілфосфорил-2-кетобета-D-еритро-пентоза редуктаза.

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*.

МОЗ – Міністерство охорони здоров'я.

A3 – амінокислотний залишок.

ВСТУП

Розробка ефективних ліків, а в подальшому подолання епідемії туберкульозу є актуальною проблемою в сучасному світі. Оскільки більшість ліків проти туберкульозу мають токсичну дію на організм людини, постає актуальність у пошуку ефективних інгібіторів ферментів збуднику туберкульозу людини – *Mycobacterium tuberculosis*, які б не мали токсичного впливу на організм пацієнта.

Кваліфікаційна робота бакалавра була виконана в рамках наукового проекту Національного фонду досліджень №0120U104883 під керівництвом наук. спів. відділу геноміки та молекулярної біотехнології Державної Установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України».

Об'єктом дослідження є декапренілфосфоріл-бета-D-рибозна оксидаза (DrpE1).

Основною метою роботи є дослідження особливостей ліганд-білкової взаємодії специфічних інгібіторів з DRPE1, як ключової мішені таргетного лікування туберкульозу. Інгібування активності DRPE1 може використовуватись у лікуванні туберкульозу людини та тварин.

Завдання, поставлені відповідно до мети кваліфікаційної роботи бакалавра, полягають у наступному:

- 1) Охарактеризувати DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*.
- 2) Виконати порівняння структур DRPE1 різних представників роду *Mycobacterium*, дослідити чи є гомологічні з DRPE1 послідовності в організмі людини.
- 3) Реконструювати просторову структуру DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*.

- 4) Проаналізувати хімічні бази даних на наявність інгібіторів, дослідити їхню активність.
- 5) Виконати ліганд-білковий докінг.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Стан проблеми та її актуальність

Туберкульоз – інфекційне захворювання людей та тварин, яке найчастіше зосереджується в органах дихальної системи, але може мати й позалегенову форму, яка уражує різні органи або їх системи. Дані Всесвітньої організації охорони здоров'я свідчать про те, що кожен рік на туберкульоз хворіє 10 мільйонів людей, з яких півтора мільйони помирає внаслідок хвороби [1]. Зокрема, в Україні за даними МОЗ на 2021 рік на туберкульоз хворіє 18 241 людина, що вище на 4,3% у порівнянні з 2020 роком [2].

Актуальною проблемою в лікуванні туберкульозу є підбір вдалих ліків з найменшою кількістю побічних ефектів на різні системи органів, а також своєчасна та точна діагностика хвороби [3]. Тому слід зосередити увагу на розробці ліків, які націлені на унікальні білкові мішені *Mycobacterium*, і при цьому не мають аналогів у протеомі тварин та людини. Таким чином, подібні препарати не будуть мати такого високого токсичного впливу на організм пацієнта, як у вже відомих ліків.

1.2. Загальна характеристика епімераз

Епімерази – ферменти родини ізомераз, які каталізують зміни положення асиметричних груп в епімерах, які мають понад один центр

симетрії. Дія більшості відомих епімераз базується на здатності каталізувати реакції з високою стереоспецифічністю. Наявна хіральність у ферментів та їх здатність переорієнтовувати як субстрати, так і каталітичні залишки дозволяє епімеразам вибірково оптимізувати стереоізомерний перехідний стан. Така специфічність є дуже важливою, оскільки в природі є тенденція використовувати один енантіомер молекули в тих чи інших метаболічних шляхах (наприклад, L-амінокислоти та D-цукри). Щоб стереохімічне перетворення відбулось, епімерази мають розірвати зв'язки в молекулі, на яку діють, та відновити їх не стереоспецифічним чином. В біологічних молекулах зазвичай епімерази діють на наступні зв'язки: карбон-карбон, карбон-водень, карбон-гетероатом (Нітроген або Оксиген). Більшість відомих епімераз діють саме на стереогенний центр, який знаходиться близько до карбонільної групи, і розривають C-H зв'язок. pK_a (константа дисоціації) водню знижується внаслідок резонансної стабілізації аніона, що утворюється в результаті реакції. Це дозволяє епімеразам використовувати механізми репротонування та депротонування в реакціях, які вони каталізують [4].

Проте в деяких випадках, коли $pK_a > 30$, тобто в молекулі відсутні кислі протони, епімерази діють на субстрати іншими каталітичними стратегіями [5]. Наприклад, відбувається окислення сусідньої з стереоцентром гідроксильної групи, щоб активувати стереоцентр. Таким чином діє UDPgalactose 4-епімераза. Але іноді зустрічаються кофактор-незалежні представники епімераз, які діють на неактивовані стереоцентри. Прикладами таких ферментів у бактерій є UDP-N-глюкозамін 2-епімераза та L-рибулоза 5-фосфат 4-епімераза.

UDP-N-глюкозамін 2-епімераза каталізує оборотне перетворення UDP-N-ацетилглюкозаміну у UDP-N-ацетилманнозамін (Рис. 1.1.). Цей фермент потрібен для аактивованої форми залишків ManNac (UDP-ManNac), яка потрібна бактеріям для біосинтезу полісахаридів

клітинної стінки. Для активності цієї епімерази непотрібні екзогенні кофактори або йони металів. Натомість UDP-N-глюкозамін 2-епімераза регулюється власним субстратом (UDP-GlcNAc).

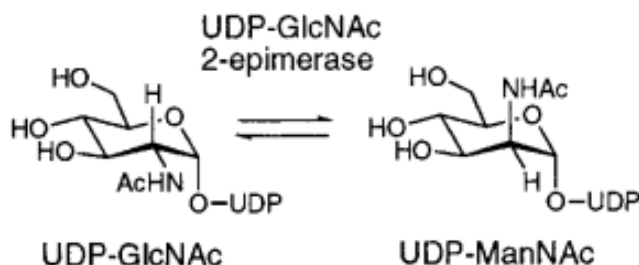


Рис. 1.1 – Реакція перетворення UDP-N-ацетилглюкозаміну у UDP-N-ацетилманнозманін, яку каталізує UDP-N-глюкозамін 2-епімераза [6]

L-рибулоза 5-фосфат 4-епімераза – фермент бактерій, який каталізує оборотне перетворення L-рибулоза-5-фосфата (L-Ru5P) на D-ксилулозу-5-фосфат (DXu5P) за допомогою йона двохвалентного металу (Рис. 1.2.). Цей фермент діє на стереогенному центрі, який не несе кислотний протон. Як і UDP-N-глюкозамін 2-епімераза, L-рибулоза 5-фосфат 4-епімераза не використовує NAD^+ , що виключає використання окисно-відновних механізмів. Окрім того, також не використовуються ізотопи ^2H та ^{18}O , що вказує на низьку вірогідність використання механізмів депротонування/репротонування.

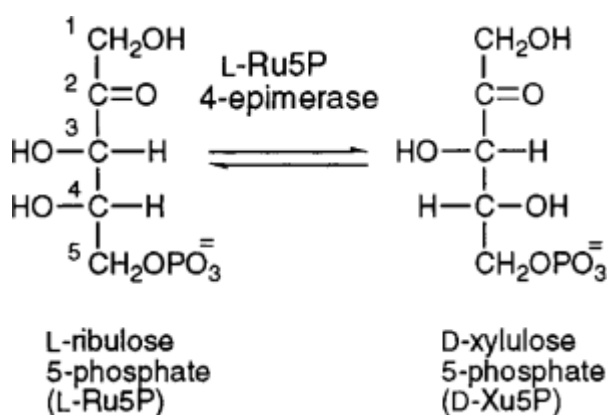


Рис. 1.2 – Приклад реакції перетворення L-рибулоза-5-фосфата (L-Ru5P) на D-ксилулозу-5-фосфат, яку каталізує L-рибулоза 5-фосфат 4-епімераза [7]

До кофактор-залежних епімераз бактерій належить набагато більше ферментів. Наприклад, до таких епімераз відноситься UDP-галактоза 4-епімераза (GALE), ADP-L-гліцero-D-манногептоза 6-епімераза (AGME).

GALE каталізує оборотне перетворення UDP-глюкози в UDP-галактозу шляхом інверсії стереохімії в С4 положенні (Рис. 1.3.). Кофактором у даного ферменту виступає NAD^+ . Таким чином в організмі зникає необхідність синтезувати обидва цукри *de novo* [8].



Рис. 1.3 – Приклад реакції перетворення UDP-глюкози в UDP-галактозу, яку каталізує UDP-галактоза 4-епімераза [9]

AGME каталізує перетворення ADP-D-гліцero-D-манногептози у ADP-L-гліцero-D-манногептозу (Рис. 1.4.). Кофактором для цього ферменту є NADP^+ . Цей фермент є дуже важливим для грам-негативних бактерій, адже ADP-L-гліцero-D-манногептоза є компонентом ЛПС клітинної стінки бактерій. [10].

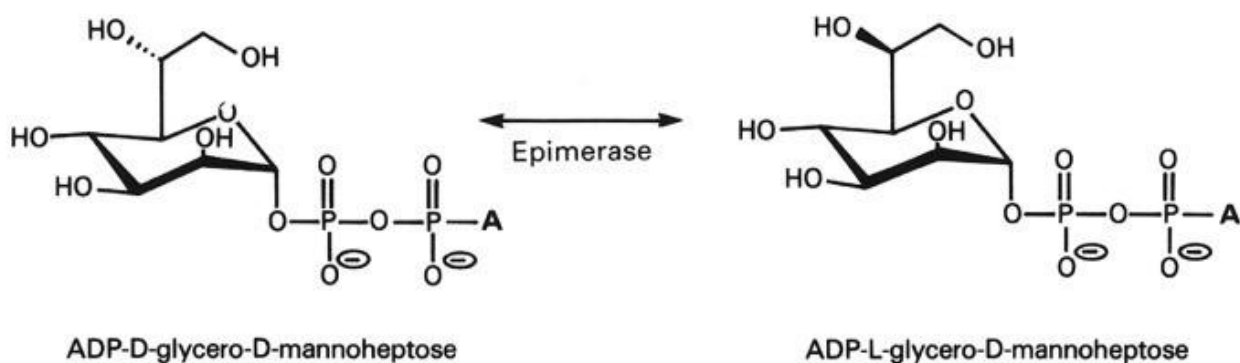


Рис. 1.4 – Приклад реакції перетворення ADP-D-гліцеро-D-манногептози у ADP-L-гліцеро-D-манногептозу, яку каталізує AGME [11]

DRPE1 також належить до кофактор-залежних епімераз. Кофактором для DRPE1 виступає FAD. DRPE1 каталізує перший етап епімеризації, а саме окислення C2' гідроксилу DRP, з подальшим утворенням проміжного продукту декапреніл-фосфо-2'-кетод-арабінози (DPX) (Рис. 1.5.) [12].

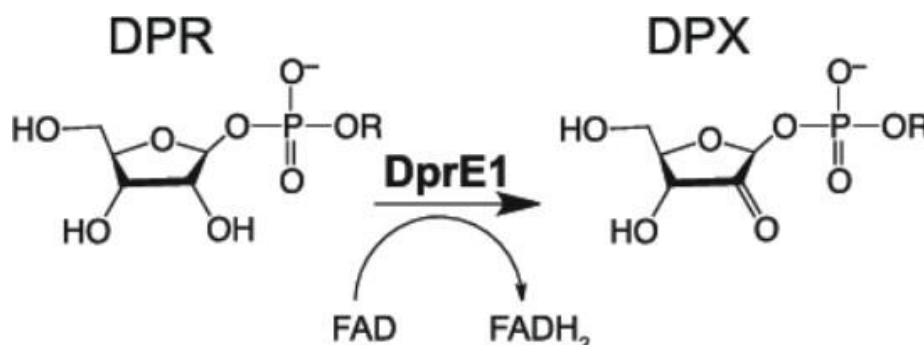


Рис. 1.5 – Приклад реакції перетворення DRP у DPX, яку каталізує DRPE1 [13]

1.3. Класифікація та просторова структура DRPE1

DRPE1 відноситься до ізомераз, до субкласу рацемаз і епімераз. Даний ензим являється епімеразою. DRPE1 відноситься до класу EC 5.1.3, адже діє на вуглеводи та їх похідні. Такі епімерози діють не на один хіральний центр молекули, як, наприклад, рацемази, а одразу на декілька хіральних атомів [14].

DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* має довжину в 461 амінокислоту і містить два домени: FAD-зв'язуючий та субстрат-зв'язуючий домени. DRPE1 на 22% складається з α -спіралі та на 26% з β -листів, які містять завитки, розташовані у випадковому порядку (Додаток А) [13].

FAD-зв'язуючий домен включає залишки 7-196 та 413-461 амінокислоти, складається з β 1- β 4 та β 5- β 9 листів і α 1- α 4 та α 11- α 13 спіралей

FAD-зв'язуючий домен складається з більшого N-кінця та меншого C-кінця. FAD виконує функцію переносу електронів. На відміну від багатьох оксидаз, DRPE1 та FAD не пов'язані між собою ковалентно, хоч сам кофермент знаходиться всередині ензиму.

Субстрат-зв'язуючий домен складається з антипаралельних β -листів ($\beta 10$ - $\beta 16$), які повернуті до середини домену, та з $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ спіралей, які приєднані до задньої частини ензиму. Цей домен включає неупорядковані залишки 269-297 та 316-330, які беруть участь в розпізнаванні субстрату та утворення комплексу з DRPE2. (Рис. 1.6.) [15].

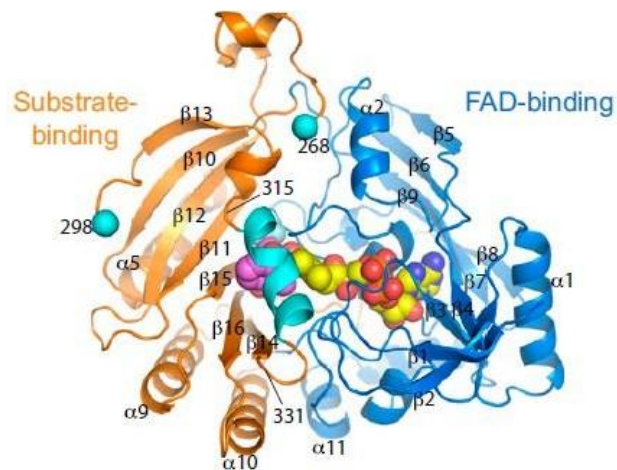


Рис. 1.6 – Гексагональна кристалічна форма DRPE1 у комплексі з лігандом СТ319. FAD-зв'язуючий домен зображений синім кольором, а субстрат-зв'язуючий – помаранчевим. FAD зображений жовтими сферами. Блакитними сферами зображено неупорядковані ділянки субстрат-зв'язуючого домену [16]

1.4. Роль DRPE1 у клітині

DRPE1 каталізує FAD-залежну реакцію перетворення DPR у DPX, під час якої також відновлюється флавін до FADH₂. Ця реакція є дуже

їхньої хімічної будови. Це, наприклад, бензотіазинони, азаіндоли, бензотіазоли, бензохіноксаліни, динітробензаміди, піразолопіридини, а інші ароматичні або гетероароматичні речовини [19].

До інгібіторів на основі бензотіазинону відносять нітробензотіазинон (BTZ), який блокує синтез арабінана в *Mtb*. Найбільшу інгібуючу активність має саме BTZ043 (8-nitro-2-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)-6-trifluoromethyl-1,3-benzothiazin-4-one) (Рис. 1.8.).

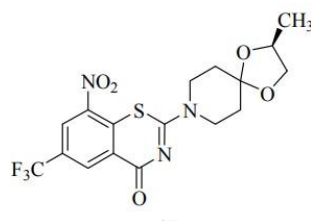


Рис. 1.8 – Молекула BTZ043 (8-nitro-2-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4,5]decan-8-yl)-6-trifluoromethyl-1,3-benzothiazin-4-one) [20]

Цей інгібітор специфічний для DRPE1 *Mtb*, а також селективний саме для вірулентного штаму *Mtb* H37Rv. Також перевагою даного інгібітору є низька токсичність, що було підтверджено дослідженнями *in vitro*. Були проведені дослідження з радіоактивно міченими молекулами BTZ043, щоб зрозуміти локалізацію дії, і було виявлено, що інгібітор направлений на реакцію синтезу арабіногалактана, який безпосередньо бере участь у синтезі клітинної стінки. Молекула BTZ043 зв'язується ковалентно по His139, Gln343, Cys394 та Lys425 залишках ферменту.

Також серед інгібіторів на основі бензотіазинону належать ті, які не взаємодіють ковалентно з ензимом. Наприклад, BTZ119, в якому нітрогрупа заміщена пірольним кільцем. Хоч в дослідженнях *in vitro* дана сполука показала гарні властивості, в *in vivo* дослідженнях не було виявлено жодної активності. Можливо, це пов'язано з відсутністю нітрогрупи, яка необхідна для ковалентного зв'язування з ензимом для

подальшої активності. Також було виявлено, що нековалентний інгібітор прикріплюється до ензиму в тій самій площині, що й VTZ043, тобто біля залишку Cys387 [21].

У якості інгібітора бензотіазольної будови було представлено сполуку TCA1 (Рис. 1.9.), яка зв'язується з DRPE1 переважно гідрофобними та Ван дер Ваальсовими взаємодіями з залишками Lys134, Ser228, Tyr314, Val365, Lys367, Asn385 і Lys418. Ці амінокислотні залишки розташовуються біля області, де DRPE1 зв'язується з FAD [22].

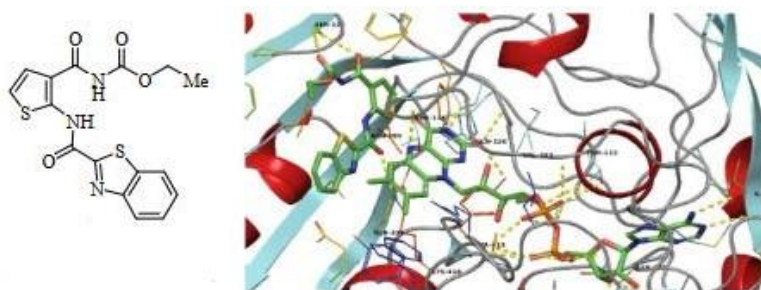


Рис. 1.9 – Молекула бензотіазолу TCA1 (зліва); кристалічна структура DRPE1 та TCA1, який приєднаний біля FAD області. Жовтими пунктирами позначені взаємодії з залишками амінокислот [22]

Тріазоли також демонструють свою інгібуючу активність, але для неї є важливою наявність нітрогрупи. Проведені експерименти з використанням декількох штамів Mtb, а саме один штам дикого типу, чотири – мутантні форми дикого типу, які не мають гену, що кодує Cys387 у DRPE1. В отриманих результатах показано, що DRPE1 дикого штаму ковалентно зв'язується з Cys387, а мутантні штами не зв'язувались з тріазолом (Нітрозаміщений тріазол 1-(4-(третбутил)бензил)-3-нітро-1H-1,2,4-тріазол (Рис. 1.10.)). Встановлено, що сполука, яку використовують у якості інгібітора обов'язково має містити нітрогрупу для ковалентної взаємодії з

DRPE1 [23].

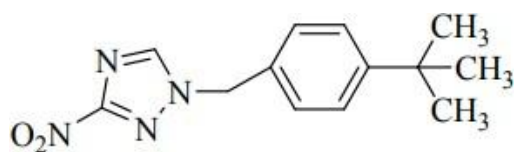
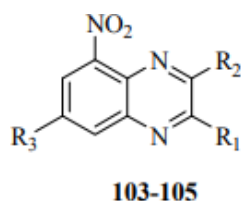


Рис. 1.10 – Молекула нітрозаміщеного тріазолу (1-(4-(третбутил)бензил)-3-нітро-1H-1,2,4-тріазол) [23]

Хіноксаліни мають нетоксичну та немутагенну інгібуючу активність. Експериментально з 12 000 зразків було відібрано 3, які мають спільну будову і відрізняються радикалами (Рис. 1.11). Дані інгібітори також ковалентно взаємодіють з DRPE1, призводячи до втрати ферментативної активності. Механізм інгібування подібний до бензотіазинонів.



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	MIC (μM)
103	CH ₃	Phenyl	Br	3.1
104	CH ₃	Phenyl	CF ₃	0.75
105	Phenyl	CH ₃	CF ₃	6.25

Рис. 1.11 – Загальна будова молекули хіноксалінів, що виявляють активність інгібітора [23]

Хіноксаліни, які не взаємодіють ковалентно з езимом, зв'язуються біля флавінового кільця FAD гідрофобними взаємодіями. Це відбувається по Val365, Pro316, Cys387, Leu368, His132, Gly133, Lys367, Lys134, Ser22 і Phe369 залишках [24].

Нітробензаміди також мають інгібуючу активність на DRPE1. Було проведено скринінг 56 984 синтетичних молекул, 486 з яких були активними, які пізніше піддали методу послідовного розведення. В ході досліджень стало відомо, що 135 молекул мали MIC менше 5 μM. Далі було відібрано 1 молекулу з найкращою активністю при найменших можливих концентраціях.

Даний інгібітор ковалентно зв'язується з DRPE1 по залишку Cys387 та блокує синтез ДРА, що унеможлиблює подальше утворення клітинної стінки бактерії [25].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Структурне вирівнювання молекули DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та споріднених видів.

Для вирівнювання було використано амінокислотні послідовності DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium decipiens*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium simulans*, *Mycobacterium lacus*, *Mycobacterium spongiae*, *Mycobacterium innocens*, *Mycobacterium intermedium*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium shinjukuense*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium bourgelatii*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium Angelicum*, а також амінокислотну послідовність 24-дегідрохолестерол редуктази людини. Послідовності були взяті з бази даних UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Структурне вирівнювання було здійснено в програмі MEGA (<https://www.megasoftware.net/>) на основі алгоритму ClustalW.

2.2. Реконструкція 3D-моделі DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*

Для побудови 3D-моделі було використано амінокислотні послідовності, які отримані з бази даних UniProtKB. Подальша реконструкція моделі DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* здійснювалась за допомогою серверу SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

2.3. Верифікація побудованих моделей білків

Верифікацію отриманих моделей DRPE1 було здійснено у сервісі MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>). Було враховано статистичні показники зв'язків ("all atoms Clashscore"), показники внутрішньої геометрії на основі побудованих карт Рамачандрана (Poor rotamers, Ramachandran favored, Ramachandran outliers, Residues with bad bonds, Residues with bad angles), оцінку якості моделей за показниками Z-score та функції QMEAN6 у сервері «SWISS-MODEL Workspace».

2.4. Аналіз інгібіторів та їх активність

Для пошуку інгібіторів було використано базу даних ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Пошук інгібіторів для DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* здійснювався на основі їхніх амінокислотних послідовностей, які були взяті з бази даних UniProtKB. Подальший аналіз активності інгібіторів було здійснено в програмі Excel MS Office.

2.5. Підготовка структур DRPE1 та лігандів для докінгу

Відібрані раніше інгібітори з бази даних ChEMBL було використано, як вихідні дані для докінгу. Молекули було відібрано за наступними критеріями: наявність підтвердженої активності, а також наявність взаємодії за стандартними показниками бази даних ChEMBL менше, ніж 10 000 нМ. При подальшій підготовці до докінгу також оцінювалась кількість донорів та акцепторів водневого зв'язку у молекулах інгібіторів.

Було використано плагін Ligprep – Schrodinger ligand preparation product, в якому здійснювалась підготовка лігандів, яка включала 2D–3D перетворення, генерування варіацій, верифікацію та оптимізацію структур. В плагін Ligprep – Schrodinger ligand preparation product завантажувались інгібітори у форматі *.sdf.

2.6. Докінг відібраних хітів

Карта сайту зв'язування створювалась у Receptor grid generation у плагіні Maestro (ліцензія НВП “І.Ф.ЛАБ”). Після виконання створення сітки рецептора, ліганди зв'язуються з білком за участі протоколу докінгу Grid based Ligand Docking with Energetics.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз структури DRPE1 різних представників *Mycobacterium* та їх порівняння

Фермент DRPE1 відіграє важливу роль в утворенні клітинної стінки у *Mycobacterium*, оскільки каталізує перетворення DPR у DPX, який є компонентом надмембранного комплексу.

За допомогою сервісу BLAST було проаналізовано амінокислотну послідовність DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та виявлено гомологічні послідовності ензиму DRPE1 у інших представників роду *Mycobacterium*, а також в людини. Ідентичність послідовностей у *Mycobacterium bovis* – 100%, *Mycobacterium canettii* – 99.57%, *Mycobacterium decipiens* – 93.10%, *Mycobacterium haemophilum* – 89.15%, *Mycobacterium simulans* – 89.59%, *Mycobacterium lacus* – 90.24%, *Mycobacterium spongiae* – 90.63%, *Mycobacterium innocens* – 88.94%, *Mycobacterium intermedium* – 88.87%, *Mycobacterium gastri* – 88.94%, *Mycobacterium shinjukuense* – 87.88%, *Mycobacterium szulgai* – 88.50%, *Mycobacterium bourgelatii* – 88.01%, *Mycobacterium kansasii* – 88.50%, *Mycobacterium marinum* – 88.15%, *Mycobacterium Angelicum* – 87.90%. З DRPE1 у людини є співпадіння лише у послідовності 24-дегідрохолестерол редуктази, яке складає 29.17%. Ці дані підтверджує множинне вирівнювання на рисунку 3.1. та рисунку 3.2.

На основі отриманих результатів можна стверджувати про специфічність DRPE1 для роду бактерій *Mycobacterium*, оскільки ідентичність послідовностей DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* коливається від 87.88% (*Mycobacterium shinjukuense*) до 100% (*Mycobacterium bovis*).

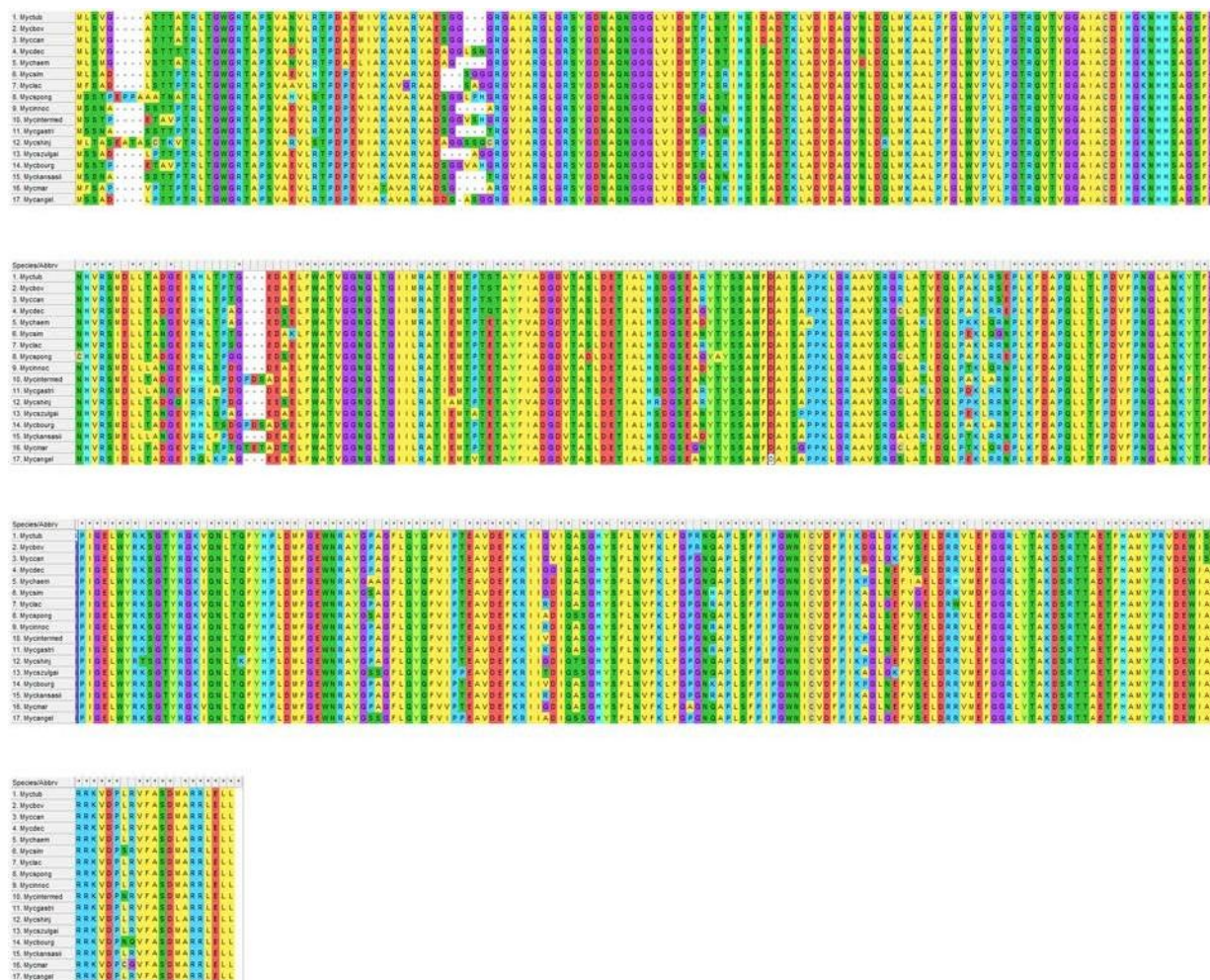


Рис. 3.1 – Множинне вирівнювання послідовностей DRPE1 різних представників *Mycobacterium*

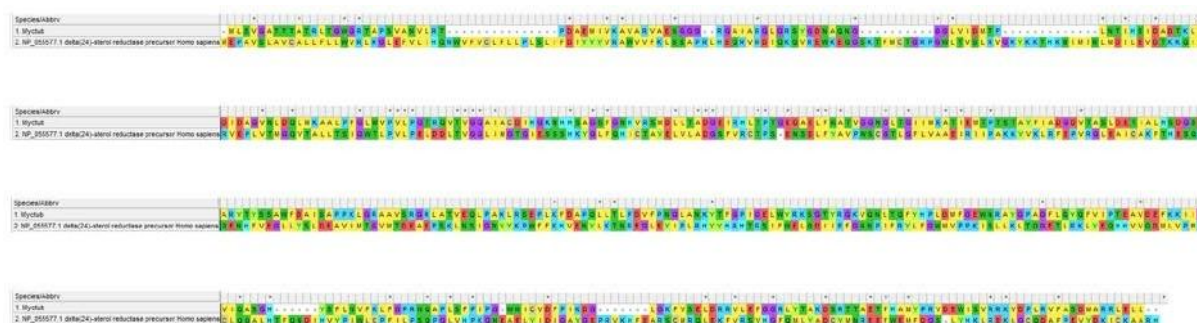


Рис. 3.2 – Множинне вирівнювання послідовності DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та 24-дегідрохолестерол редуکتаси людини

3.2. Реконструкція просторової структури DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*

Для побудови послідовності DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* було використано послідовність білку P9WJF1 з бази даних UniProtKB та реконструйовано на сервері SWISS-MODEL. Реконструйований білок складається з 461 амінокислотних залишків, молекули FAD та ковалентно зв'язаного інгібітору Y22 (6-(трифторметил)-3-{[4-(трифторметил)бензил]аміно}хіноксалін-2 карбонова кислота).

Якість отриманої структури була оцінена на сервері MolProbity. Clash Score атомів оцінена в 0.70, QMEANDisCo Global в 0.91, що вказує на високу якість реконструйованої моделі білку.

На карті Рамачандрана (Рис. 3.3.) реконструйована структура DRPE1 має наступні показники: залишки в бажаних областях – 98,68% (454/461), залишки в дозволених областях – 99,78% (459/461), також відмічено 1 outliers (phi, psi) – Pro329 (-88,71, -123,42).

Для побудови послідовності DRPE1 *Mycobacterium bovis* було використано послідовність білку A0A1R3Y598 з бази даних UniProtKB та реконструйовано на сервері SWISS-MODEL. Реконструйована модель білку містить 461 амінокислотний залишок, молекулу FAD та ковалентно зв'язаний інгібітор G1T (8-(оксиданіламіно)-2-пиперидин-1-іл-6-(трифторметил)-1,3-бензотіазин-4-он).

Якість отриманої структури була оцінена на сервері MolProbity. Clash Score атомів оцінена в 1,55, QMEANDisCo Global в 0,89, що також свідчить про гарну якість реконструйованої моделі ензиму.

На карті Рамачандрана (Рис. 3.4.) реконструйована структура DRPE1 має наступні показники: залишки в бажаних областях – 97,35% (448/461), залишки в дозволених областях – 99,78% (459/461), також відмічено 1 outliers (phi, psi) – Pro276 (-110,68, 133,65).

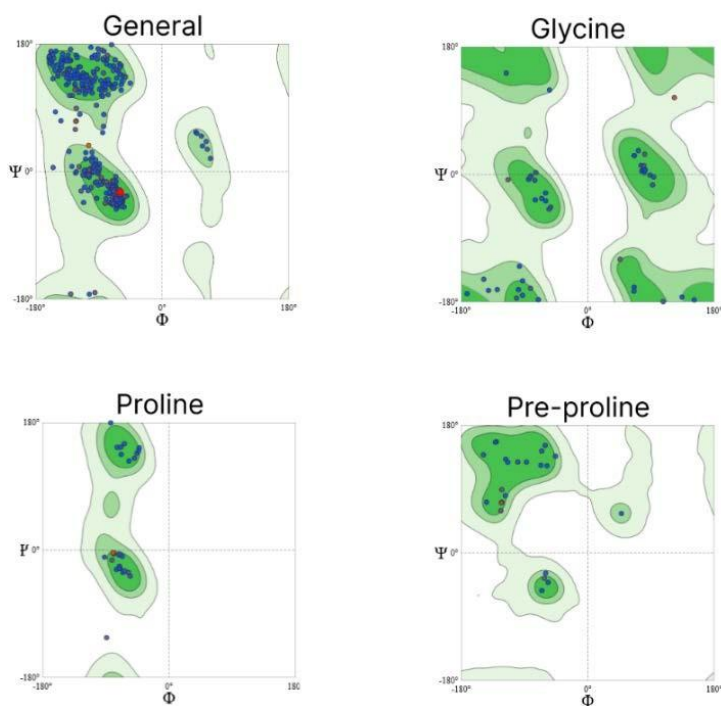


Рис. 3.3 – Карта Рамачандрана реконструйованої структури
DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis*

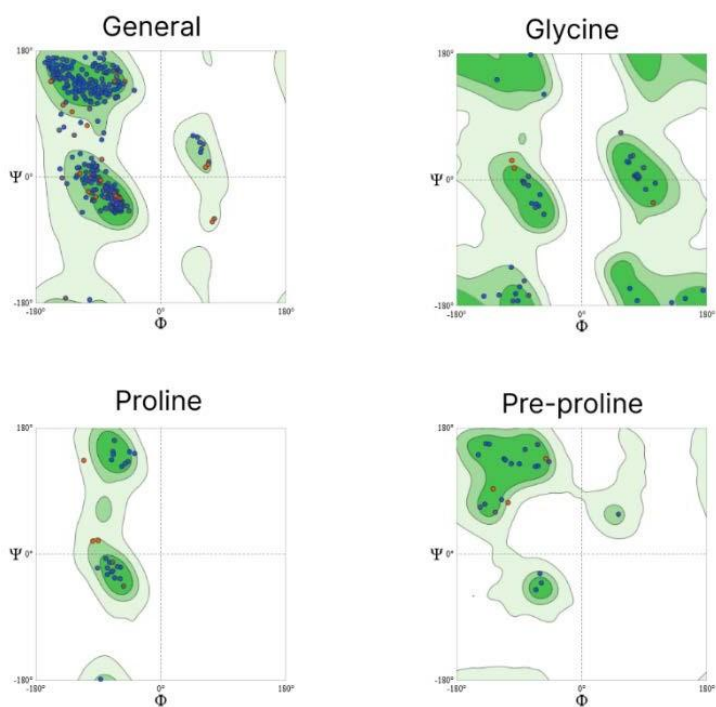


Рис. 3.4 - Карта Рамачандрана реконструйованої структури
DRPE1 *Mycobacterium bovis*

Також було порівняно 3-D моделі DRPE 1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* (Рис. 3.5.). Моделі демонструють між собою значну подібність.

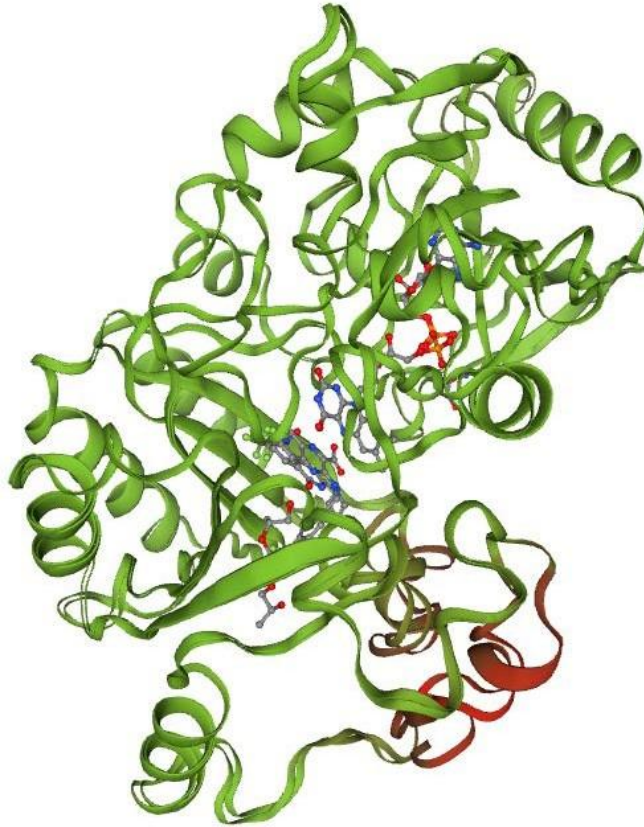


Рис. 3.5 – Порівняння 3-D моделей DRPE 1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*

Також подібність моделей була оцінена за допомогою тесту різниці локальних відстаней (The Local Distance Difference Test) [26]. Оцінювалась відстань в парних міжатомних відстанях по атому $C\alpha$ (Рис. 3.6.). За результатами тесту значні відмінності є у 2 амінокислотних залишків: LYS260 THR311. Показники узгодженості DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* для LYS260 0,79 та 0,92 відповідно. Для THR311 0,79 та 0,86 відповідно.

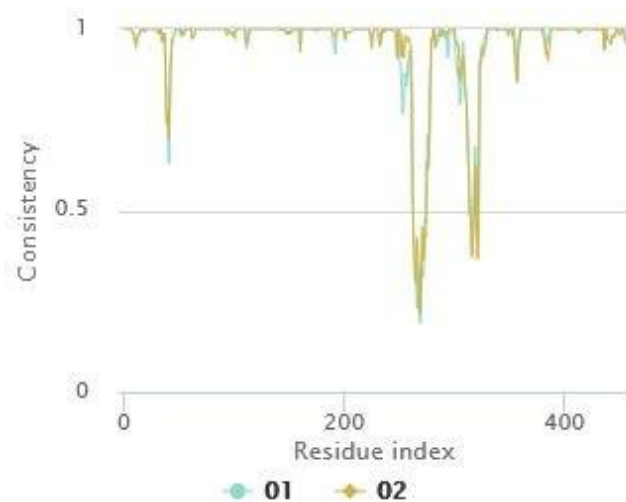


Рис. 3. 6 – Графік результатів тесту різниці локальних відстаней для моделей DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*. Блакитним кольором показано дані DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis*, жовтим – DRPE1 *Mycobacterium bovis*. На осі ордината розміщені дані узгодженості амінокислотних залишків, на осі абсциса – індекс амінокислотного залишку

3.3. Аналіз ліганд-білкових взаємодій

Для DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* було знайдено 194 молекули інгібуючих речовин. 37 з них мають підтвержену активність, 22 неактивні по відношенню до DRPE1, 135 не мають підтверджених даних про активність. Зі 135 таких молекул було відкинуто ті, які проявляють активність за стандартними показниками бази даних ChEMBL більше, ніж 10 000 нМ, а саме 16 речовин. Таким чином для подальших досліджень було відібрано 156 відомих інгібіторів DRPE1, проте вони не мають експериментально встановлених просторових структур ліганд-білкових комплексів, що відкриває можливість дослідження особливостей їх взаємодій.

3.4. Підготовка структур для молекулярного докінгу

Ліганди, завантажені з бази даних ChEMBL та відібрані за критеріями, показаними у пункті 3.3., були завантажені у плагін Maestro 11.5 у форматі *.sdf. Подальша підготовка здійснювалась за допомогою інструменту Ligand Preparation.

Кристалічні структури DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis*, які раніше були реконструйовані на сервері SWISS-MODEL, були підготовлені за допомогою інструменту Protein preparation.

Подальше генерування рецепторної сітки здійснювалось за допомогою інструменту Receptor Grid Generation.

3.5. Результати молекулярного докінгу

В результаті попередньої підготовки структур, було проведено молекулярний докінг, в результаті якого було отримано інформацію, по яким саме амінокислотним залишкам зв'язується ліганд з ферментом, а також розрахунки молекулярної динаміки для кожного ліганд-білкового комплексу.

Таким чином були отримані наступні дані для сайтів зв'язування з основним ланцюгом (Backbone interaction) (Табл. 3.1.).

Табл. 3.1 – Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами в основному ланцюзі

A3	К-ть сполук	A3	К-ть сполук	A3	К-ть сполук
Lys275	46	Ala280	201	Gly409	150
Ile276	779	Gly282	282	Val425	81
Gly277	477	Glu345	37	Gly426	63
Gln278	538	Leu347	158	Lys538	149
Gly279	244	Gly350	262	Thr541	218

Також було проаналізовано кількість інгібіторів та сайти зв'язування з полярними амінокислотними залишками (Табл. 3.2.).

Табл. 3.2 – Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які пов'язані з полярними амінокислотними залишками

АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук
Glu274	89	Thr353	141	Asn394	326
Gln278	63	Asp354	253	Asp407	779
Ser281	685	Asp389	503	Thr427	443
Arg299	495	Lys391	702	Lys538	236
Glu315	72	Asp393	581	Thr541	253

У результаті докінгу також було досліджено, що ряд інгібіторів взаємодіють з DRPE1 гідروفобними зв'язками (Табл. 3.3.).

Табл. 3.3 – Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які пов'язані гідروفобними взаємодіями

АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук
Ile 276	710	Ile312	37	Phe410	615
Ala280	149	Val328	54	Pro428	80
Val284	546	Met344	29	Tyr429	89
Ala297	192	Tyr346	519	Trp430	138
Leu311	54	Leu396	294	Leu465	80

Було досліджено, з якими саме амінокислотними залишками взаємодіють інгібітори у якості акцепторів водневого зв'язку (Табл. 3.4.), а також у якості донорів водневого зв'язку (Табл. 3.5.).

Також було досліджено з якою кількістю інгібіторів взаємодіють ароматичні амінокислотні залишки (Табл. 3.6.) та заряджені амінокислотні залишки (Табл. 3.7.).

Табл. 3.4 – Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які є акцепторами водневого зв'язку

АЗ	К-ть сполук
Glu274	37
Ile276	29
Gln278	22
Asp354	37
Asp389	113
Asp393	98
Asp407	201

Табл. 3.5 - Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які є донорами водневого зв'язку

АЗ	К-ть сполук
Gln278	29
Ser281	98
Arg299	54
Tyr346	29
Lys391	322

Табл. 3.6 - Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які взаємодіють з ароматичними амінокислотними залишками

АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук
Tyr346	517	Tyr429	89
Phe410	603	Trp430	115

Табл. 3.7 - Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, які взаємодіють з зарядженими амінокислотами

АЗ	К-ть сполук	АЗ	К-ть сполук
Glu274	106	Asp389	495
Glu295	46	Lys391	693
Arg299	495	Asp393	572
Glu315	89	Asp407	771
Asp354	244	Lys538	227

Сполуки з найбільшим значенням docking score (Табл. 3.8.) були відібрані, щоб детально візуалізувати їхні сайти зв'язування (Додаток Б).

Табл. 3.8 – Аналіз результатів докінгу DRPE1 з інгібіторами, у яких найбільше значення docking score

PubChem ID	A3	docking score	glide gscore	glide emodel
6448768	391, 407	-7.034	-7.034	-72.370
6448767	346, 389, 391	-6.282	-6.282	-73.520
6448767	346, 389, 391	-6.240	-6.240	-71.120
6448767	346, 389, 391	-6.197	-6.197	-67.462
5808883	389, 391	-6.182	-6.182	-63.910
78410777	281, 347	-6.152	-6.152	-62.464

Для візуалізації сайтів зв'язування було застосовано інструмент Ligand detection. Сайти зв'язування оцінювались в 2D та 3D структурах.

Спираючись на вище наведені дані, можна відмітити, що найкраща взаємодія з DRPE1 у сполуки PubChem ID 6448768.

Результати молекулярного ліганд-білкового докінгу підтверджують дані з дослідженої раніше літератури: ліганди зв'язуються у переважній мірі з FAD-зв'язуючим доменом.

ВИСНОВКИ

1. На основі проаналізованої літератури у Розділі 1, було встановлено, що бактеріальний фермент DRPE1 відіграє важливу роль у побудові клітинної стінки бактерій. Таким чином інгібування DRPE1 *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* робить їх більш вразливими до ліків, а також імунної системи людини та тварин.
2. В результаті біоінформатичних досліджень було встановлено, що DRPE1 з *Mycobacterium tuberculosis* та *Mycobacterium bovis* мають 100% ідентичність послідовностей, тоді як серед інших представників мікобактерій показники коливаються від 80-100%. Висока консервативність мішені дозволила використати метод моделювання по гомології для побудови структури DRPE1 з *Mycobacterium bovis*. В результаті аналізу по гомології сиквенсу було показано, що DRPE1 висококонсервативний білок.
3. На основі аналізу хімічних баз даних та профільного пошуку було встановлено 172 структури інгібіторів з підтвердженою активністю менше ніж 10000 нМ, 156 найбільш різноманітних структур інгібіторів було відібрано для подальшого аналізу.
4. На основі аналізу ліганд-білкових взаємодій за допомогою молекулярного докінгу було встановлено, що більшість лігандів переважно зв'язуються з доменом DRPE1, який містить FAD.

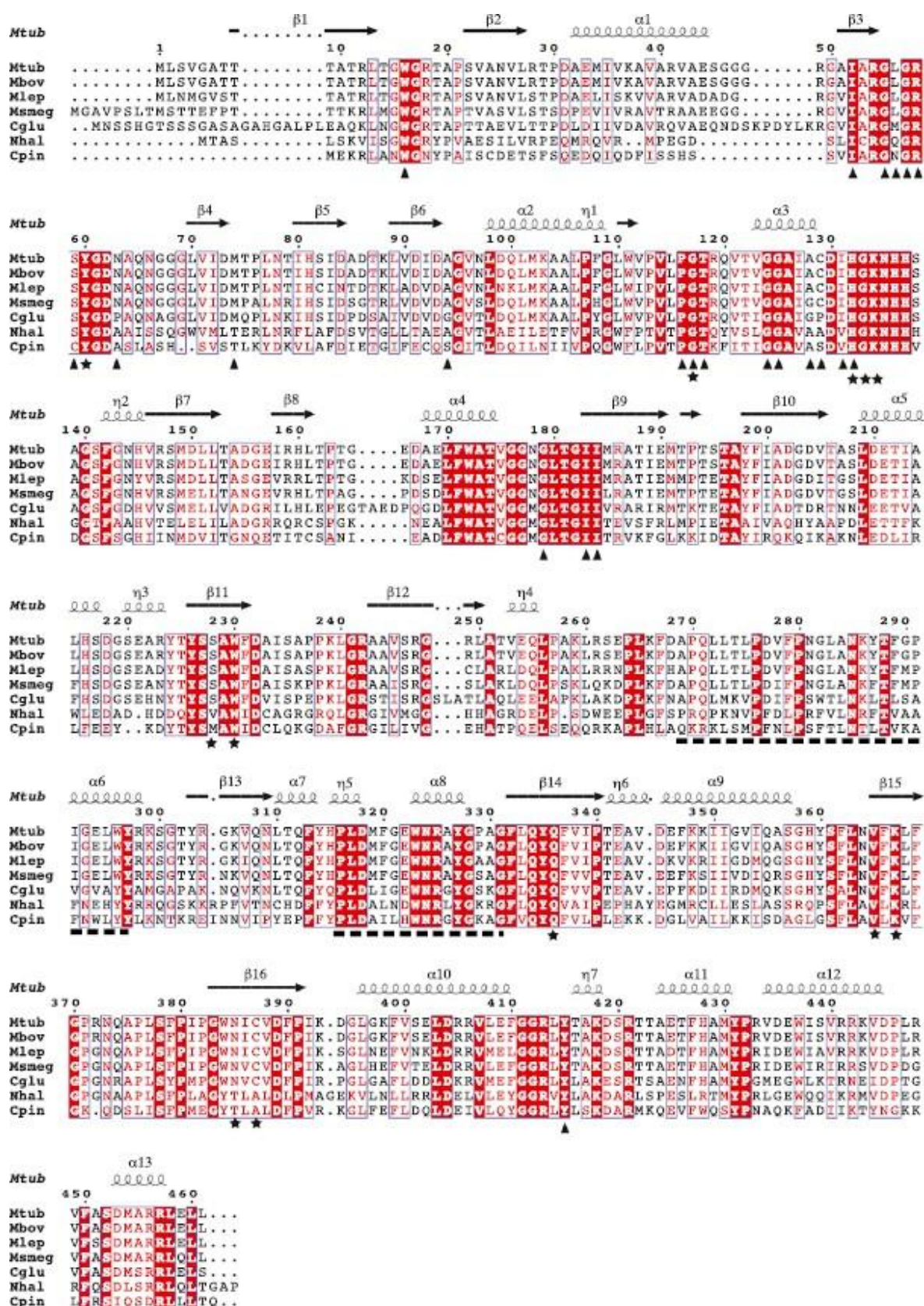
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. World Health Organization [електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: https://www.who.int/health-topics/tuberculosis#tab=tab_1 (дата звернення: 15.04.2022).
2. Центр громадського здоров'я МОЗ України [електронний ресурс]: українська версія / Режим доступу: <https://phc.org.ua/kontrol-zakhvoryuvan/tuberkuloz/statistika-z-tb> (дата звернення: 15.04.2022).
3. Perspectives on Advances in Tuberculosis Diagnostics, Drugs, and Vaccines / M. Schito [et al.]. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2015. – Vol. 61. P. 102-118.
4. Allard S. T. M. Epimerases: structure, function and mechanism. / S. T. M. Allard, M.-F. Giraud, J. H. Naismith // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2001. – Vol. 58(11). – P. 1650–1665.
5. Tanner M. E. Understanding Nature's Strategies for Enzyme-Catalyzed Racemization and Epimerization. / M. E. Tanner // *Accounts of Chemical Research*. – 2002. – Vol. 35(4). – P. 237–246.
6. Kawamura T. Enzymatic Synthesis of Uridine Diphosphate N-Acetyl-D-Mannosaminuronic acid. / T. Kawamura, N. Ishimoto, E. Ito // *J. Biol. Chem.* – 1979. – Vol. 254. – P. 8457-8465.
7. Tanner M. E. Inversion of Stereocenters. In *Comprehensive Biological Catalysis*. / M. E. Tanner, G. L. // Academic Press: San Diego. – 1998. – Vol. 2. – P. 21-37.
8. Thoden J. B. High-resolution X-ray structure of UDP-galactose 4-epimerase complexed with UDP-phenol. / J. B. Thoden, P. A. Frey, H. M. Holden // *Protein Sci.* – 1996. – Vol. 5. – P. 2149–2161.
9. Holden H. M. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. / H.M. Holden, I. Rayment, J. B. Thoden // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278 (45). – P. 43-78.

10. The crystal structure of ADP-L-glycero-D-mannoheptose 6-epimerase: catalysis with a twist / A. M. Deacon [et al.]. // *Structure*. – 2000. – Vol. 8. – P. 453-462.
11. Evidence that NADP⁺ Is the Physiological Cofactor of ADP-l-glycero-d-mannoheptose 6-Epimerase / Y. Ni [et al.]. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276(29). – P. 27329–27334.
12. Benzothiazinones: Prodrugs that covalently modify the decaprenylphosphoryl- β -D-ribose-2'-epimerase DprE1 of *Mycobacterium tuberculosis* / C. Trefzer [et al.]. // *J Am Chem Soc*. – 2010. – Vol. 132. – P. 13663–13665.
13. Structural basis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* DprE1 by benzothiazinone inhibitors / S. M. Batt [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109(28). – P. 11354–11359.
14. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) [електронний ресурс]: англійська версія / Режим доступу: <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/> (дата звернення: 29.04.2022).
15. Structure, Dynamics, and Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DprE1 and DprE2 Examined by Molecular Modeling, Simulation, and Electrostatic Studies / I. Bhutani [et al.]. // *PLOS ONE*. – 2015. – Vol. 10(3). – P. 1-31.
16. Decaprenylphosphoryl- β -D-ribose 2 ' -epimerase from *Mycobacterium tuberculosis* is a magic drug target / G. Manina [et al.]. // *Curr Med Chem*. – 2010. – Vol. 17. – P. 3099–3108.
17. DprE1 Is a Vulnerable Tuberculosis Drug Target Due to Its Cell Wall Localization / M. Brecik [et al.]. // *ACS Chemical Biology*. – 2015. – Vol. 10(7). P. 1631–1636.
18. Overview of the Development of DprE1 Inhibitors for Combating the Menace of Tuberculosis / R. V. Chikhale [et al.]. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 5. – P. 1-102.

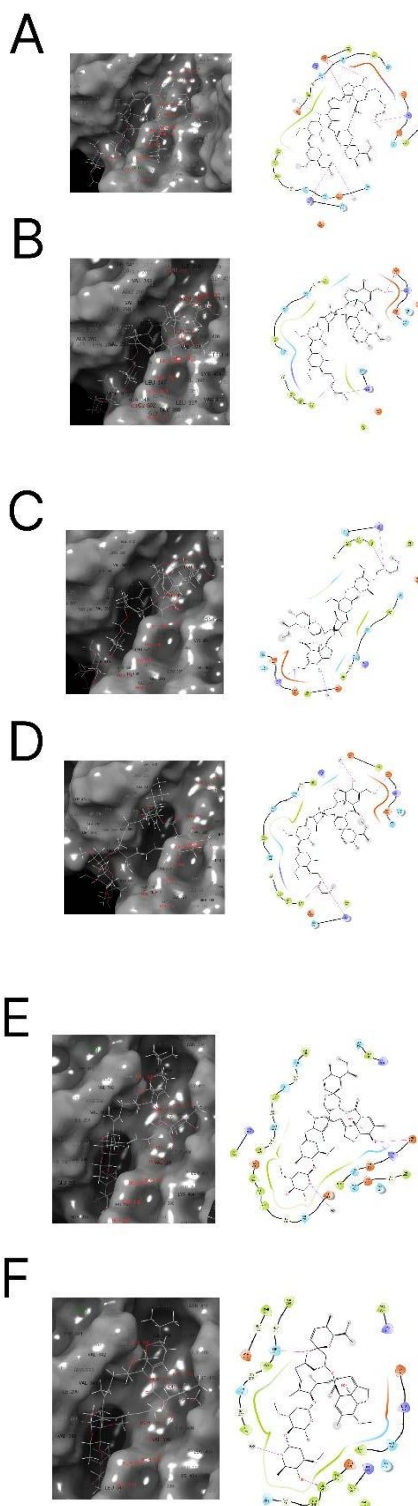
19. Wang F. Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis. / F. Wang, D. Sambandan // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2013. – Vol. 110. – P.2510-2517.
20. Determinants of the inhibition of DprE1 and CYP2C9 by antitubercular thiophenes. / R. Liu [et al.]. // Angew. Chem. Int. Ed. – 2017. – Vol. 56. – P. 13011-13015.
21. Makarov V. The 8-pyrrole-benzothiazinones are noncovalent inhibitors of DprE1 from *Mycobacterium tuberculosis*. / V. Makarov // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 59. – P. 4446-4452.
22. Whole cell target engagement identifies novel inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* decaprenylphosphoryl- β -d-ribose oxidase. / S. M. Batt [et al.]. // ACS Infect. Dis. – 2015. – Vol. 1. – P. 615-626.
23. Stanley S. A. Identification of novel inhibitors of *M. tuberculosis* growth using whole cell based high-throughput screening. / S. A. Stanley // ACS Chem. Biol. – 2012. – Vol. 7. – P. 1377-1384.
24. Neres J. 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through noncovalent inhibition of DprE1. / J. Neres // ACS Chem. Biol. – 2014. – Vol. 10. – P. 705-714.
25. Christophe T. High content screening identifies decaprenylphosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors. / T. Christophe // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5. – P. 64-79.
26. IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests / V. Mariani [et al.]. // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29. – P. 2722-2728.

Визначення вторинної структури та вирівнювання послідовностей DRPE1 у мікобактерій та споріднених видів



Чорними трикутниками показано залишки, які утворюють нековалентні зв'язки з FAD. Чорними зірками – залишки, які контактують з інгібітором СТ325. Чорним пунктиром показано максимальну довжину невідпорядкованих ділянок. Mtub – *Mycobacterium tuberculosis*; Mbov – *Mycobacterium bovis*; Mlep – *Mycobacterium leprae*; Msmeg – *Mycobacterium smegmatis*; Clgu – *Corynebacterium glutamicum*; Nhal – *Nitrosococcus halophilus* Nc4; Cpin – *Chitinophaga pinensis* DSM 2588. [13].

Візуалізація сайтів зв'язування лігандів з DRPE1



A – Візуалізація сайту зв'язування для сполуки PubChem ID 6448768. Справа показано сайт зв'язування у 3D, зліва – у 2D.

B-D – Візуалізація сайту зв'язування для сполук PubChem ID 6448767.

Справа показано сайт зв'язування у 3D, зліва – у 2D.

E – Візуалізація сайту зв'язування для сполуки PubChem ID 5808883. Справа показано сайт зв'язування у 3D, зліва – у 2D.

F – Візуалізація сайту зв'язування для сполуки PubChem ID 78410777. Справа показано сайт зв'язування у 3D, зліва – у 2D.