

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту молекулярної біології і
генетики НАН України,
академік НАН України
М.А. Тукало



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2020 році в рамках реалізації проекту
із виконання наукових досліджень і розробок

Сайт-спрямований мутагенез як інноваційний підхід для дослідження механізмів виникнення та подолання резистентності *Mycobacterium tuberculosis* до антибіотиків
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: ”Підтримка досліджень провідних та молодих учених”
Рєєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0075

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (рєєстраційний номер та назва Проєкту) рєєстраційний номер проекту: 2020.02/0075, назва проекту: “Сайт-спрямований мутагенез як інноваційний підхід для дослідження механізмів виникнення та подолання резистентності *Mycobacterium tuberculosis* до антибіотиків”

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу “Підтримка досліджень провідних та молодих учених” протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Тривалість виконання Проєкту
Початок – 29 жовтня 2020 року;
Закінчення – 2022 рік.

Загальна вартість Проєкту, грн.
8 000 000

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік	<u>1 200 000-</u>
2-й рік	<u>3 700 000</u>
3-й рік	<u>3 100 000</u>

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 7 виконавців, з них:
доктори наук 1 ;
кандидати наук 6 ;

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Грантоотримувач – Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, код ЄДРПОУ – 05417101, вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Метою роботи є розробка інгібіторів лейцил-тРНК синтетази та метіоніл-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* та сайт-спрямований мутагенез цих ензимів для вивчення механізмів розвитку резистентності *M. tuberculosis*.

4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

1. Провести докінг колекції сполук у активні сайти лейцил-тРНК синтетази (ЛейРС) та метіоніл-тРНК синтетази (МетРС) *M. tuberculosis* та зробити вибірку сполук для тестування на інгібувальну активність.
2. Застосувати моделі штучних нейронних мереж для вибірки сполук.
3. Одержати рекомбінантні ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis*.
4. Дослідити інгібувальну активність відібраних речовин.
6. Провести сайт-спрямований мутагенез ЛейРС та МетРС *in silico* та *in vitro*.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

- Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Туберкульоз є однією з найнебезпечніших інфекційних хвороб. Основною проблемою при лікуванні туберкульозу є множинна стійкість збудника туберкульозу до антибіотиків. Тому, розробка нових стратегій для подолання резистентності *M. tuberculosis* є важливим завданням сучасної науки. На сьогодні, перспективними молекулярними мішенями для розробки антибіотиків є аміноацил-тРНК синтетази. Однак, їх недоліком є висока частота виникнення мутацій, що обумовлює резистентність.

- Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Застосування сайт-спрямованого мутагенезу амінокислотних залишків аміноацил-аденілат зв'язувальних сайтів аміноацил-тРНК синтетаз *in silico* із наступним експериментальним мутагенезом є виключно новою стратегією для вивчення проблеми розвитку та подолання резистентності *M. tuberculosis* до антибіотиків.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Віртуальний скринінг колекції сполук проводиться за допомогою методів докінгу та моделювання штучних нейронних мереж. Для розрахунку вільної енергії утворення комплексів аміноацил-тРНК синтетаз із інгібітором застосовується алгоритм *umbrella sampling*. Рекомбінантні ЛейРС та МетРС одержані в *Escherichia coli*. Інгібувальна активність сполук досліджується в реакції аміноацилювання. Сайт-спрямований мутагенез буде проведено за протоколом *Stratagene*.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:

У процесі виконання проєкту проведено молекулярний докінг колекції сполук, що налічує більше 150 тисяч лігандів у аміноацил-аденілат зв'язувальні сайти гомологічної моделі лейцил-

тРНК синтетази (ЛейРС) та кристалічної структури метіоніл-тРНК синтетази (МетРС) *M. tuberculosis*.

За результатами віртуальних скринінгів створено фокусовані бібліотеки сполук для тестування на інгібувальну активність щодо рекомбінантних аналогів ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis*. Відібрано 68 сполук для дослідження інгібувальної активності щодо обох ензимів - ЛейРС та МетРС, 25 речовин для тестування лише на МетРС та 22 сполуки для тестування тільки на ЛейРС.

Ген МетРС ампліфікували з геномної ДНК *M. tuberculosis* та клонували в системі pCRII-Toro Cloning. Отриманий фрагмент переклонували у вектор pET28b із використанням сайтів рестрикції NcoI та HindIII. Отриману ДНК клону використали для електропорації клітин *E. coli* BL21 (DE3) Star. Очистку білка проводили за допомогою афінної хроматографії та гель-фільтрації.

Для виділення ЛейРС *M. tuberculosis* було використано раніше сконструйовану надпродуктивну конструкцію на основі бактерії *E. coli*. Плазмиду pET28a, яка містить ген ЛейРС *M. tuberculosis* трансформували в клітини Rosetta (DE 3). Для індукування синтезу рекомбінантного білка ЛейРС використовували модифікований протокол аутоіндукції. Очистку білка проводили за допомогою афінної хроматографії.

Було одержано рекомбінантні аналоги ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis* у достатній кількості для досліджень з інгібіторами.

За результатами скринінгу усіх відібраних 115 сполук, що досліджували на інгібувальну активність щодо ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis* в реакції аміноацилювання тРНК ідентифіковано 9 ефективних інгібіторів МетРС *M. tuberculosis*, що пригнічують активність фермента більше, ніж на 50% при концентрації 100 μ M та 7 інгібіторів ЛейРС. Серед цих сполук лише одна є одночасно інгібітором ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis*.

За даними молекулярного докінгу було також відібрано 41 сполуку серед класу 3-феніл-5-(1-феніл-1H-[1,2,3]тріазол-4-іл)-[1,2,4]оксадіазолів для дослідження на інгібувальну активність щодо ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis*, а також на антибактеріальну активність щодо моно-резистентних штамів *M. tuberculosis* H37Rv – рифампін-резистентного штаму H37Rv (*rpoB*^{S450L}), ізоніазид-резистентного штаму H37Rv (*katG*^{del}) та моксіфлоксацин-резистентного штаму H37Rv (*gyrA*^{D94K}).

За результатами досліджень інгібувальної активності похідних 3-феніл-5-(1-феніл-1H-[1,2,3]тріазол-4-іл)-[1,2,4]оксадіазолу ідентифіковано 10 речовин, що проявляють інгібувальну активність щодо МетРС та 3 сполуки, що пригнічують активність ЛейРС більше, ніж на 50% при концентрації 100 μ M.

За даними на антибактеріальну активність похідних 3-феніл-5-(1-феніл-1H-[1,2,3]тріазол-4-іл)-[1,2,4]оксадіазолу щодо патогенних штамів *M. tuberculosis* H37Rv, що були одержані в Colorado State University (№ контракту 75N93019D00005) ідентифіковано 4 сполуки, активні стосовно моно-резистентних штамів *M. tuberculosis*. Виявилося, що серед них одна сполука – 3-(5-Хлоро-2-метокси-феніл)-5-[3-(4-флуоро-феніл)-[1,2,4]оксадіазол-5-іл]-3H-[1,2,3]тріазол-4-іламін, яка має антибактеріальну активність щодо рифампін-резистентного штаму *M. tuberculosis* H37Rv (*rpoB*^{S450L}), проявляє значну інгібувальну активність щодо МетРС. Встановлено, що ця сполука не цитотоксична щодо клітинних ліній HEK293 та HepG2 і може бути використана для подальшої хімічної оптимізації і біологічних досліджень.

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проекту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

1. У процесі виконання першого етапу проекту одержано препаративні кількості рекомбінантних аналогів лейцил-тРНК синтетази та метіоніл-тРНК синтетази *M. tuberculosis* у розчинній формі.
2. Знайдено низькомолекулярні інгібітори лейцил-тРНК синтетази та метіоніл-тРНК синтетази *M. tuberculosis*, що відповідають критеріям Ліпінського ($M_r < 500$ Да, $\log P \leq 5$, кількість донорів водневого зв'язку менше 5, кількість акцепторів водневого зв'язку менше 10) та правилам Вебера (кількість обертальних зв'язків ≤ 10 , площа полярної поверхні ≤ 140 Å).

3. Розроблено інгібітор МетРС *M. tuberculosis* – 3-(5-Хлоро-2-метокси-феніл)-5-[3-(4-флуоро-феніл)-[1,2,4]оксадіазол-5-іл]-3Н-[1,2,3]тріазол-4-іламін, що пригнічує активність фермента на 51% при концентрації 100 μ М та інгібує ріст рифампін-резистентного штаму *M. tuberculosis* H37Rv (*rpoB*^{S450L}) більше, ніж на 80% у діапазоні концентрацій 2-20 мг/мл. Цей інгібітор є нетоксичним на клітинних лініях HEK293 та HepG2 (IC₅₀ > 50 μ М).

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Вперше розроблено інгібітор метіоніл-тРНК синтетази *M. tuberculosis* серед похідних 3-феніл-5-(1-феніл-1Н-[1,2,3]тріазол-4-іл)-[1,2,4]оксадіазолу, що інгібує ріст рифампін-резистентного штаму *M. tuberculosis* H37Rv (*rpoB*^{S450L}).

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Розроблені інгібітори аміноацил-тРНК синтетаз *M. tuberculosis* можуть бути використані для дослідження функцій цих ензимів на рівні мережі метаболічних шляхів клітини.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

У перспективі розроблені інгібітори лейцил-тРНК синтетази та метіоніл-тРНК синтетази *M. tuberculosis* можуть бути основою для подальшої оптимізації з метою розробки протитуберкульозних препаратів із новими механізмами дії.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

Завідувач відділу біомедичної хімії

Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

Д.х.н., проф.

(посада)

Ярмолюк С.М.

ПІБ

(підпис)