

ЗАТВЕРДЖУЮ
Керівник підприємства/установи/організації
(Грантоотримувача)
Директор Інституту молекулярної біології і генетики
НАН України
(посада)
Михайло БУКАЛЮ
(Власне ім'я та ПРІЗВИЩЕ)



АНОТОВАНИЙ ЗВІТ
про виконану роботу у 2021 році в рамках реалізації проєкту
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
Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0075

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту) 2020.02/0075 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 (назва конкурсу) протокол від «16-17» вересня 2020 року № 21

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 07 травня 2021 року
(дата укладання Договору про виконання наукового дослідження і розробки)

Закінчення – 15 грудня 2021 року

Загальна вартість Проєкту, грн.

7 811 000,00

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 200 000,00

2-й рік 3 511 000,00

3-й рік 3 100 000,00

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 7 виконавців, з них:

доктори наук 1 ;
кандидати наук 6 ;
інші працівники _____.

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 *Esheria 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:

Для розробки інгібіторів метіоніл-тРНК синтетази (МетРС) та лейцил-тРНК синтетази (ЛейРС) *Mycobacterium tuberculosis* застосовано метод машинного навчання.

У процесі реалізації проєкту побудовано двокласову нейронну мережу та дві баєсові моделі для вибірки потенційних інгібіторів МетРС *M. tuberculosis*. ROC-скор для нейронної мережі становив 0,74, для баєсових моделей – 0,78 та 0,81. Коефіцієнт кореляції Метьюса для докласової нейронної мережі становив 0,38, а для баєсових моделей – 0,78 та 0,81.

Побудовано дві двокласові нейронні мережі та одну баєсову модель для вибірки потенційних інгібіторів ЛейРС *M. tuberculosis*. ROC-скор для нейронних мереж становив 0,80 та 0,93, для баєсової моделі – 0,75. Коефіцієнт кореляції Метьюса для двокласових нейронних мереж становив 0,80 та 0,93, а для баєсової моделі – 0,49. Також побудовано моделі штучних нейронних мереж для пошуку сполук з подвійною інгібувальною активністю щодо ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis*. ROC-скор для моделей ЛейРС був 0,86. ROC-скор для моделей МетРС був 0,88. Відібрано 213 сполук для тестування інгібувальної активності щодо ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis in vitro*.

Одержано рекомбінантні аналоги ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis* у препаративних кількостях.

Для отримання МетРС *M. tuberculosis* використовували раніше сконструйовану конструкцію на основі бактерії *E. coli*. Плазмиду рЕТ28b, яка включає ген МетРС *M. tuberculosis* трансформували методом 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 рЕТ28a, 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.

Відібрані методом машинного навчання сполуки тестували на інгібувальну активність щодо ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis* у реакції аміноацилювання. За результатами скринінгу ідентифіковано 12 інгібіторів ЛейРС серед похідних N-феніл-2-(хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетаміду та 11 інгібіторів МетРС серед похідних N-(1-бензил-1H-бензоімідазол-2-ілметил)-бензаміду та 2-(хінолін-2-ілсульфаніл)-N-тіофен-2-іл-ацетаміду, що пригнічують активність ензимів більше, ніж на 50% при концентрації 100 μM , а також знайдено один інгібітор – 4,5-диметил-2-[2-(4-метилхінолін-2-ілсульфаніл)-ацетиламіно]-тіофен-3-карбоксильної кислоти метиловий естер, що пригнічує активність обох ензимів більше, ніж на 90% при концентрації 100 μM .

Побудовано моделі зв'язування активних сполук із амінокислотними залишками аміноацил-аденілат зв'язувальних сайтів ЛейРС та МетРС *M. tuberculosis* за допомогою методу молекулярного докінгу. Згідно з даними комп'ютерного моделювання усі сполуки в межах трьох хімічних класів мають подібний спосіб зв'язування і взаємодіють одночасно з ділянками зв'язування аденіну та амінокислоти.

Для пошуку більш ефективних інгібіторів МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis* побудовано моделі штучних нейронних мереж з урахуванням структур інгібіторів, знайдених у процесі реалізації проєкту. ROC-скор для моделей ЛейРС був у межах 0,91 – 0,95, коефіцієнт кореляції Метьюса – 0,6 – 0,87. ROC-скор для моделей МетРС був у межах 0,91 – 0,97, коефіцієнт кореляції Метьюса – 0,75 – 0,83. За результатами ліганд-орієнтованого віртуального скринінгу з використанням цих моделей було відібрано 100 сполук для дослідження на інгібувальну активність щодо рекомбінантних МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis in vitro*.

Серед 100 протестованих сполук було знайдено 17 нових інгібіторів МетРС *M. tuberculosis* та 15 нових інгібіторів ЛейРС *M. tuberculosis* з різних хімічних класів, що пригнічують активність ензимів більше, ніж на 50% при концентрації 100 μM . Виявилося, що серед знайдених інгібіторів 5 мають мультитаргетну активність, тобто інгібують одночасно МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis*.

Проведено оптимізацію інгібіторів із подвійною інгібувальною активністю щодо МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis* серед похідних 2-(хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетаміду. Серед 10 синтезованих аналогів цього класу ідентифіковано 8 інгібіторів МетРС, що пригнічують ензим в діапазоні від 29% до 88% при концентрації 50 μM та 10 інгібіторів ЛейРС, що пригнічують ензим в діапазоні від 26% до 94% при концентрації 50 μM .

Для частини досліджуваних інгібіторів серед похідних 2-(хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетаміду встановлено значення IC_{50} . Виявилось, що сполука 2-[2-(6-хлоро-4-метил-хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетиламіно]-5-феніл-тіофен-3-карбоксильної кислоти амід проявляє інгібувальну активність одночасно до МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis* зі значеннями $IC_{50} = 33 \pm 16 \mu\text{M}$ та $23,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$, відповідно.

Знайдені інгібітори із подвійною інгібувальною активністю можуть бути перспективними кандидатами для подальших досліджень з метою розробки протитуберкульозного препарату зі зниженою вірогідністю розвитку резистентності, оскільки імовірність виникнення мутацій одночасно в обох ензимів є незначною.

Для встановлення ключових амінокислотних залишків в аміноацил-аденилат зв'язувальному сайті МетРС *M. tuberculosis* з метою проведення сайт-спрямованого мутагенезу було досліджено кристалічну структуру МетРС *M. tuberculosis* у комплексі із негідролізованим аналогом метіоніл-аденилату (PDB ID: 6AX8)

Для сайт-спрямованого мутагенезу МетРС *M. tuberculosis in silico* відібрано 9 амінокислотних залишків: Ile10, Tyr12, Glu24, Asp49, Lys54, Asp263, His290, Leu293, Phe292. Проведено заміну зазначених амінокислотних залишків на аланін в амінокислотній послідовності МетРС *M. tuberculosis* у FASTA форматі. Потім побудовано гомологічні моделі кожної мutowаної форми за допомогою серверу Swiss Model, використовуючи як матрицю дику форму МетРС *M. tuberculosis* (PDB ID: 6AX8). Одержані просторові структури у PDB-форматі використали для проведення розрахунків вільної енергії зв'язування з лігандами за допомогою алгоритму umbrella sampling. За результатами розрахунків відібрано два амінокислотні залишки – Glu24 та Leu293, що за значенням вільної енергії зв'язування ($\Delta G = -25$ ккал/моль) найбільше відрізнялися від дикої форми МетРС *M. tuberculosis* ($\Delta G = -13,5$ ккал/моль), для експериментального сайт-спрямованого мутагенезу.

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

1. У процесі виконання проєкту для пошуку інгібіторів МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis* побудовано моделі штучних нейронних мереж. ROC-скор для моделей МетРС був у межах 0,91 – 0,97, коефіцієнт кореляції Метьюса – 0,75 – 0,83. ROC-скор для моделей ЛейРС був у межах 0,91 – 0,95, коефіцієнт кореляції Метьюса – 0,6 – 0,87.

2. Ідентифіковано 17 нових інгібіторів МетРС *M. tuberculosis* та 15 нових інгібіторів ЛейРС *M. tuberculosis* з різних хімічних класів, що пригнічують активність ензимів більше, ніж на 50% при концентрації 100 μM . Виявилось, що серед знайдених інгібіторів 5 мають мультитаргетну активність, тобто інгібують одночасно МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis*. Інгібітори 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 $\leq 140 \text{ \AA}^2$).

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

Вперше розроблено інгібітори метіоніл-ТРНК синтетази та лейцил-ТРНК синтетази *M. tuberculosis* серед похідних 2-(хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетаміду. Встановлено, що сполука 2-[2-(6-хлоро-4-метил-хінолін-2-ілсульфаніл)-ацетиламіно]-5-феніл-тіофен-3-карбоксильної кислоти амід проявляє інгібувальну активність одночасно до МетРС та ЛейРС *M. tuberculosis* зі значеннями $IC_{50} = 33 \pm 16 \mu\text{M}$ та $23,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$, відповідно.

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 синтетази *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)

Сергій ЯРМОЛЮК
(Власне ім'я та ПРИЗВИЩЕ)

(підпис)

