



УДК 577.32

В. В. Микуляк, І. Я. Дубей,
член-кореспондент НАН України О. І. Корнелюк

Дизайн інгібіторів активного центру тирозил-тРНК синтетази *Mycobacterium tuberculosis* на основі інгібітора SB-219383

Тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) є одним з ключових ферментів синтезу білка на дорибосомному етапі, тому його інгібування повинно істотно стримувати ріст патогенних бактерій в організмі хазяїна. MtTyrRS та TyrRS людини не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr}, тому специфічні інгібітори MtTyrRS повинні бути не токсичними для людини. Взаємодія інгібітора з каталітичною KMSKS-подібною петлею MtTyrRS повинна значно підвищити його афінність до ферменту. З урахуванням цього проведено дизайн нових інгібіторів MtTyrRS на основі структури відомого інгібітора SB-219383. Модифікація здійснювалася таким чином, щоб забезпечити взаємодію інгібіторів із каталітичною петлею ферменту. Показано, що змодельовані нами інгібітори взаємодіють з каталітичною петлею протягом усього часу динаміки MtTyrRS (100 нс).

Пошук інгібіторів тирозил-тРНК синтетаз (TyrRS) бактерій залишається актуальною проблемою [1]. TyrRS є одним із ключових ферментів дорибосомного етапу синтезу білка, специфічне інгібування цього ферменту повинно істотно стримувати ріст патогенних бактерій в організмі людини. Оскільки TyrRS бактерій та людини не здатні до перехресного розпізнавання та аміноацилювання відповідних тРНК^{Tyr}, специфічні інгібітори TyrRS бактерій можуть стати основою для розробки нових ліків [2].

Патогенна еубактерія *Mycobacterium tuberculosis* є збудником туберкульозу людини. TyrRS належить до першого класу аміноацил-тРНК синтетаз, для якого характерними є каталітичні мотиви HIGH та KMSKS [3]. Структура TyrRS *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) значно відрізняється від цитоплазматичної TyrRS людини, яка має еукаріотичний тип просторової будови, тобто іншу доменну організацію. Гомологія цих двох ферментів є низькою і становить менше 20% [2]. Більш схожу до бактеріальних TyrRS структуру має мітохондріальна TyrRS людини [4], гомологія між цим ферментом та MtTyrRS становить близько 42% [2].

© В. В. Микуляк, І. Я. Дубей, О. І. Корнелюк, 2014

Варто зауважити, що каталітичний KMSKS-подібний мотив мітохондріальної TyrRS людини має послідовність KLGKS, яка містить два залишки Lys, що є характерним для TyrRS бактерій. У MtTyrRS цей каталітичний мотив має послідовність KFGKS, тобто також містить два залишки Lys. Каталітичний мотив цитоплазматичної TyrRS людини містить тільки один залишок Lys і має послідовність KMSSS. Заряджені залишки Lys відіграють важливу роль у перебігу реакції аміноацилювання: взаємодіючи з АТФ, вони беруть участь у зв'язуванні його в активному центрі ферменту і сприяють формуванню проміжного продукту — тирозиладенілату — та подальшій його стабілізації в активному центрі ферменту. Для роботи цитоплазматичної TyrRS людини необхідна наявність іона K^+ як кофактора реакції. Він формує так званий координаційний зв'язок, тим самим компенсуючи відсутність залишку Lys в структурі каталітичного мотиву KMSSS [3, 4].

Однією з особливостей каталітичної петлі KMSKS є її висока рухливість [5]. Кристалографічні роботи не дають інформації про координати цієї петлі в мітохондріальній та цитоплазматичній TyrRS людини. Проте для TyrRS бактерій координати каталітичної петлі в кристалографічних структурах визначені [6].

Раніше проводились роботи щодо пошуку інгібіторів TyrRS бактерій [1, 7]. Одним із найширше досліджуваних є інгібітор SB-219383 та його аналоги. SB-219383 виявляє конкурентну інгібуючу активність проти *S. aureus* TyrRS ($K_i = IC_{50} = 0,6$ нМ для *S. aureus* TyrRS; $IC_{50} = 22$ мкМ для TyrRS людини) та слабку антибактеріальну активність проти *Streptococcal strains* (MIC = 32 мкг/мл) [8, 9]. Також було синтезовано ряд аналогів інгібітора SB-219383 для того, щоб зменшити його загальну полярність і, таким чином, покращити проникнення крізь клітинну стінку бактерій [10]. Нещодавно було створено інгібітор, який має хорошу інгібуючу активність проти *S. aureus* TyrRS ($IC_{50} = 0,10 \pm 0,03$ мкМ) [11], проте не взаємодіє з каталітичною петлею ферменту.

Було показано, що інгібітори, які будуть взаємодіяти з каталітичною KMSKS-подібною петлею, повинні мати вищу афінність до TyrRS бактерій порівняно з TyrRS людини [12]. Нами проведено дизайн нових інгібіторів MtTyrRS на основі структури відомого інгібітора SB-219383. Модифікація здійснювалася таким чином, щоб забезпечити взаємодію інгібіторів із каталітичною петлею ферменту.

Матеріали і методи. Редагування інгібітора SB-219383 проводилось із використанням програми PyMOL. Для додавання хімічних груп до інгібітора використано функцію Builder даної програми. Стартова конформація MtTyrRS була взята з нашої попередньої роботи [5]. Комплекси MtTyrRS із змодельованими інгібіторами отримано шляхом накладання структур нових інгібіторів на інгібітор SB-219383.

Топології силового поля для інгібіторів було побудовано за допомогою програмного забезпечення ACPYPE [13]. Розрахунки динаміки проводили, використовуючи пакет програм GROMACS 4.6.3 [14] та застосовуючи силове поле AMBER99SB-ILDN [15]. Підготовку систем для розрахунків динаміки виконували таким чином. Молекулу поміщали в бокс із водою, з мінімальною відстанню до стінки боксу 1 нм. Для нейтралізації сумарного заряду системи було додано 12 іонів Na^+ . Проведено 200 кроків мінімізації енергії системи методом крутого спуску. Урівноваження системи здійснювали в три етапи. На всіх трьох етапах проводили “стримування позицій” (англ. position restraint) для всіх важких атомів білка та інгібіторів. На першому етапі було використано ансамбль NVT, а систему врівноважено при температурі 100 К. Для контролю температури системи було застосовано алгоритм Brendsen. Фермент з інгібітором та розчин контролювалися окремо. NVT урівноваження проводилось протягом 100 пс. На другому етапі кожну систему було лінійно розігріто від 100

до 310 К протягом 1 нс, при цьому використовували ансамбль NPT і підтримували тиск в 1 атм. На цьому етапі та у всіх подальших симуляціях температуру і тиск підтримували, використовуючи алгоритми V-rescale та Parrinello–Rahman відповідно. Для фінальної стадії урівноваження системи було застосовано ансамбль NPT при температурі 310 К та тиску 1 атм протягом 1 нс. Розрахунки власне 100 нс динаміки здійснювали для кожної системи, використовуючи ансамбль NPT без будь-яких обмежень рухливості. Обмеження всіх ковалентних зв'язків проводили за допомогою алгоритму LINCS, крок розрахунків — 2 фс. Електростатичні взаємодії розраховували за допомогою алгоритму MPE. Всі нековалентні взаємодії розраховували на відстані 1 нм.

Аналіз здійснювався за допомогою програм пакета GROMACS. Середньоквадратичні флуктуації, енергії взаємодій, водневі зв'язки та відстані було обчислено через кожні 10 пс. Графіки побудовано за середніми значеннями для кожної нс. Для візуалізації структури використано PyMOL.

Результати та обговорення. Дизайн нових інгібіторів. Дизайн інгібіторів активного центру *MtTyrRS* проводився на основі структури відомого інгібітора SB-219383. Оскільки SB-219383 не взаємодіє з каталітичною петлею KFGKS, його було модифіковано таким чином, щоб забезпечити взаємодію інгібітора з каталітичною петлею в активному центрі. Як показано в роботі [12], інгібітори, які будуть взаємодіяти з каталітичною петлею, матимуть вищу афінність до *TyrRS* бактерій порівняно з *TyrRS* людини. Таким чином, нами було змодельовано два нові інгібітори активного центру *MtTyrRS*. Корову структуру інгібітора SB-219383 дещо спростили, видаливши містковий атом карбону, що утворював біциклічний фрагмент. Далі до атома кисню O28, звільненого від ковалентного зв'язку з цим атомом карбону, було приєднано групи, здатні забезпечити взаємодію з каталітичною петлею: для першого інгібітора через етиленовий лінкер CH_2CH_2 приєднали залишок бензimidазолу, що містить карбоксильну групу (інгібітор SB-219383-a), для другого — залишок бензойної кислоти через триатомний пропіленовий лінкер $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ (інгібітор SB-219383-b) (рис. 1, а).

Вибір хімічних груп для побудови нових інгібіторів здійснювався з урахуванням властивостей ділянки кишені активного центру *MtTyrRS*, з якою повинні взаємодіяти додані групи. Наявність залишку фенілаланіну зумовлює гідрофобність поверхні, а присутність каталітичних Lys231 та Lys234 свідчить про позитивний заряд ділянки. Тому очевидно, що ароматичні фенільна та бензimidазольна групи забезпечують гідрофобні взаємодії, а негативно заряджена карбоксильна група здійснює електростатичні взаємодії із позитивно зарядженими каталітичними залишками Lys231 та Lys234.

Молекули змодельованих інгібіторів займають всю кишеню активного центру *MtTyrRS* та взаємодіють із каталітичною петлею KFGKS (див. рис. 1, б) подібно до проміжного продукту реакції аміноацидування — тирозиладенілату.

Динаміка *MtTyrRS* у комплексах з інгібіторами SB-219383, SB-219383-a та SB219383-b. Для моніторингу мобільності інгібіторів у активному центрі *MtTyrRS* було розраховано середньоквадратичні флуктуації (СКФ) для їхніх важких атомів на відрізку траєкторій 20–100 нс (рис. 2). Інгібітор SB-219383 показує найнижчу рухливість атомів в області біциклічного фрагмента. Значення СКФ для атомів 17–29 становлять 0,02–0,03 нм. Вищою є рухливість для ділянки інгібітора, яка імітує L-тирозин, найвище значення СКФ має атом N10 — 0,17 нм. Частина інгібітора SB-219383-a, яка імітує L-тирозин в активному центрі *MtTyrRS*, має динаміку, подібну до SB-219383-b. Так само піковим є СКФ для атома N10, проте найвищі СКФ мають атоми 22–26. Значення СКФ для інгібітора

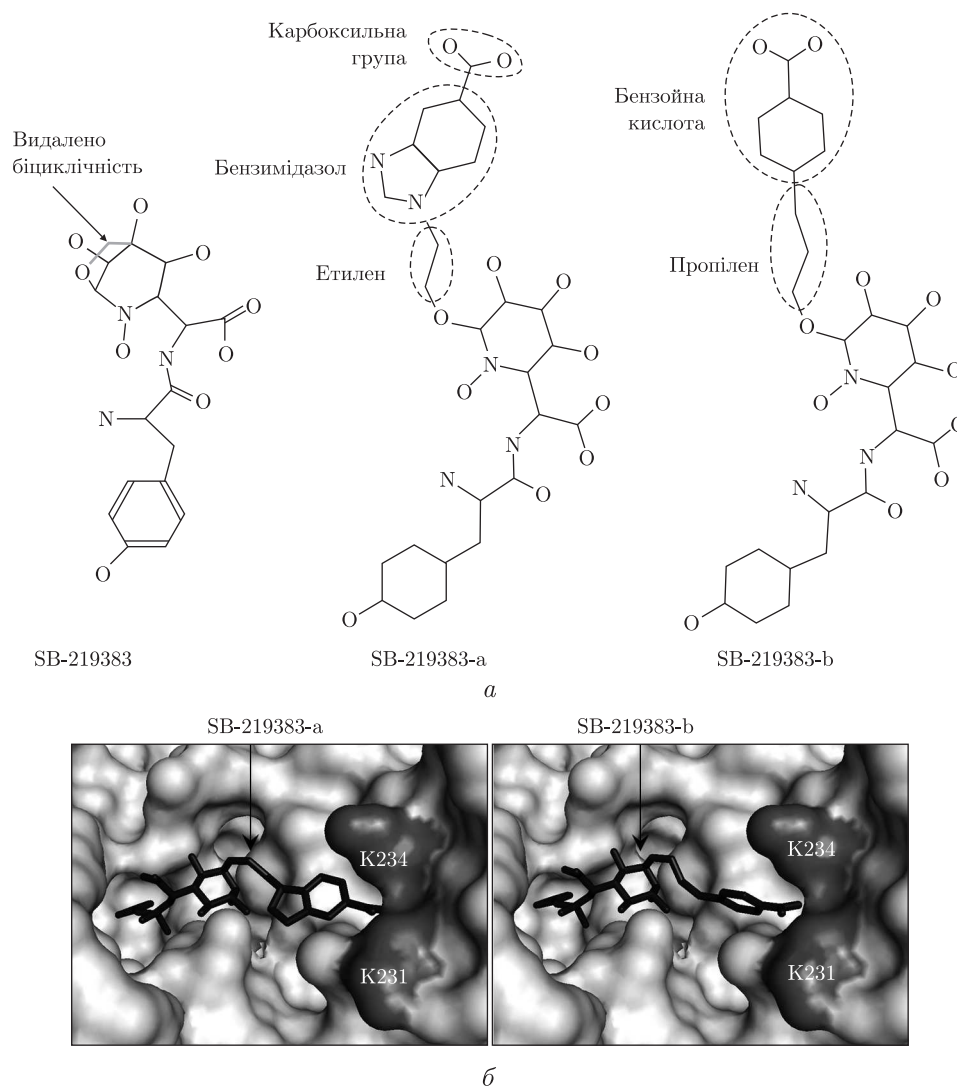


Рис. 1. Інгібітор SB-219383 та побудовані його аналоги: для першого змодельованого інгібітора видалено біциклічність і приєднано до атома оксигену етиленовий фрагмент, бензimidазол та карбоксильну групу (SB-219383-a), для другого інгібітора до атома оксигену приєднано пропіленовий фрагмент і бензойну кислоту (SB-219383-b) (a). Поверхня кишені активного центру *Mt*TyrRS та побудовані інгібітори: інгібітори займають всю кишеню активного центру *Mt*TyrRS та взаємодіють з каталітичною петлею KFGKS; карбоксильні групи інгібіторів мають електростатичні взаємодії з каталітичними залишками лізину Lys231 та Lys234 (б)

SB-219383-b знаходяться в межах 0,02–0,07 нм, лише СКФ бензойної кислоти перевищують 0,12 нм.

Енергію взаємодії інгібіторів в активному центрі було розраховано для 100 нс динаміки *Mt*TyrRS. Зокрема, окремо обчислено енергію ван-дер-ваальсових та електростатичних взаємодій (рис. 3). Значення енергії ван-дер-ваальсових взаємодій інгібіторів SB-219383-a та SB-219383-b є нижчими, ніж інгібітора SB-219383. Різниця зумовлена більшою площею взаємодіючої поверхні для нових інгібіторів відносно SB-219383, оскільки нові інгібітори містять додаткові групи. Розрахунки енергії електростатичних взаємодій інгібіторів з фер-

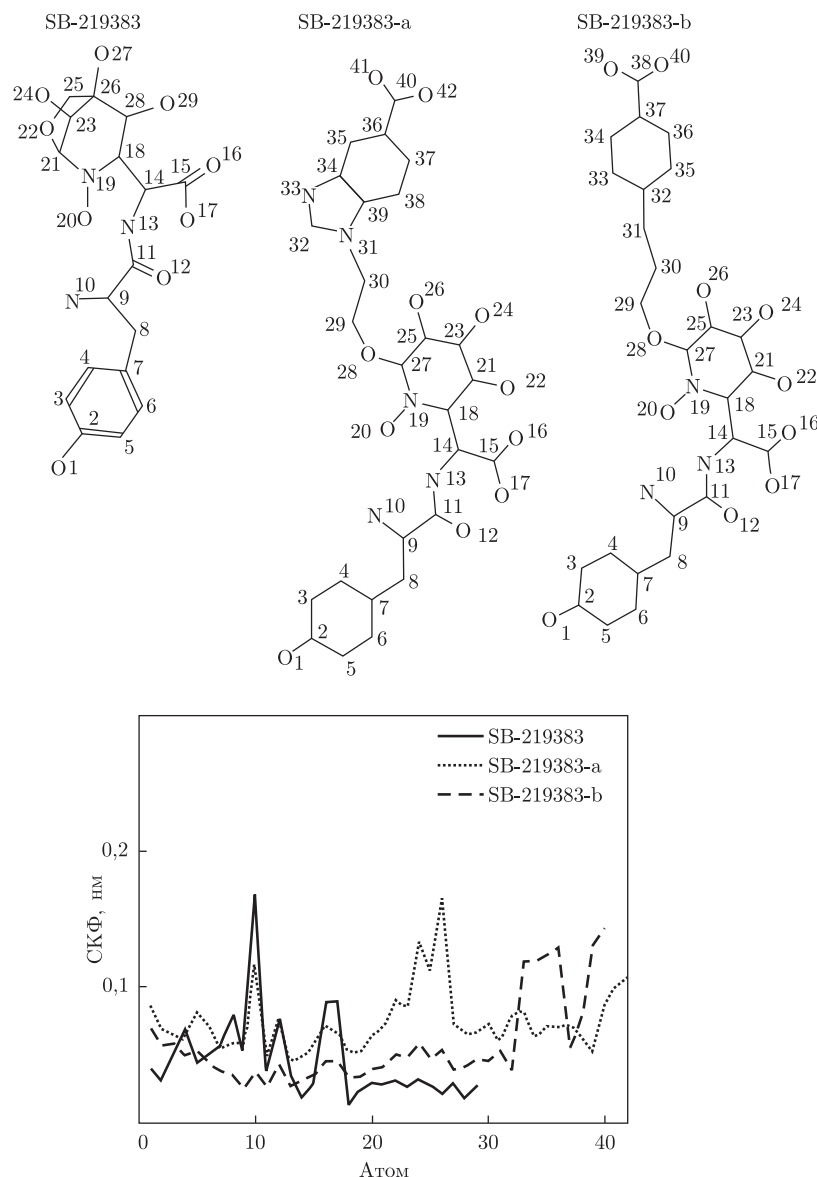


Рис. 2. Середньоквадратичні флуктуації важких атомів інгібіторів *MtTyrRS* у ході динаміки. Пікові значення флуктуацій не перевищують 2 Å

ментом показують, що для нових інгібіторів їхні значення загалом є нижчими порівняно з SB-219383. Проте, на 85-й нс динаміки SB-219383 формує водневі зв'язки із зарядженим залишком Asp40. Оскільки водневі зв'язки мають здебільшого електростатичну природу, формування додаткових зв'язків істотно відбивається на значеннях енергії електростатичних взаємодій. Таким чином, на проміжку динаміки 85–100 нс значення енергії електростатичних взаємодій для всіх трьох інгібіторів знаходяться в межах $\approx -250 \div -400$ кДж/моль.

Моніторинг зміни кількості водневих зв'язків протягом усього часу динаміки показано на рис. 4, а. Для всіх трьох інгібіторів аналіз показує динамічний характер зв'язування в кишені активного центру. Нові інгібітори утворюють більше водневих зв'язків, ніж SB-219383, однак на 85-й нс динаміки SB-219383 додатково утворює три водневі зв'язки з Asp40, які

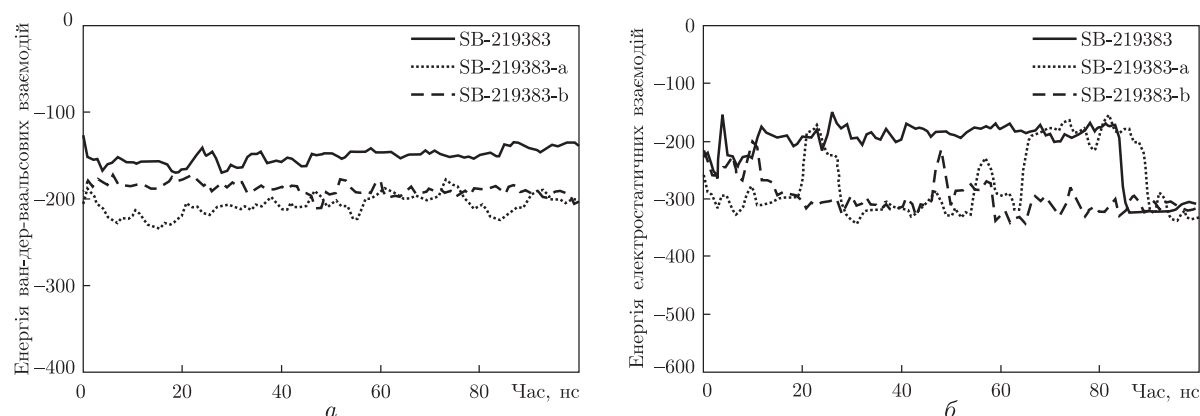


Рис. 3. Енергія взаємодії інгібіторів з ферментом в активному центрі: значення енергії ван-дер-ваальсових взаємодій інгібіторів SB-219383-a та SB-219383-b є нижчими, ніж у інгібітора SB-219383, що зумовлено більшою площею взаємодіючої поверхні (а). Енергія електростатичних взаємодій інгібіторів з ферментом (б). Значення енергій для нових інгібіторів загалом є нижчим порівняно з SB-219383. На 85-й нс динаміки SB-219383 формує водневі зв'язки із зарядженим залишком Asp40, що істотно відбивається на значеннях енергії. Таким чином, на проміжку динаміки 85–100 нс величини енергії для всіх трьох інгібіторів знаходяться в межах $\approx -250 \div -400$ кДж/моль

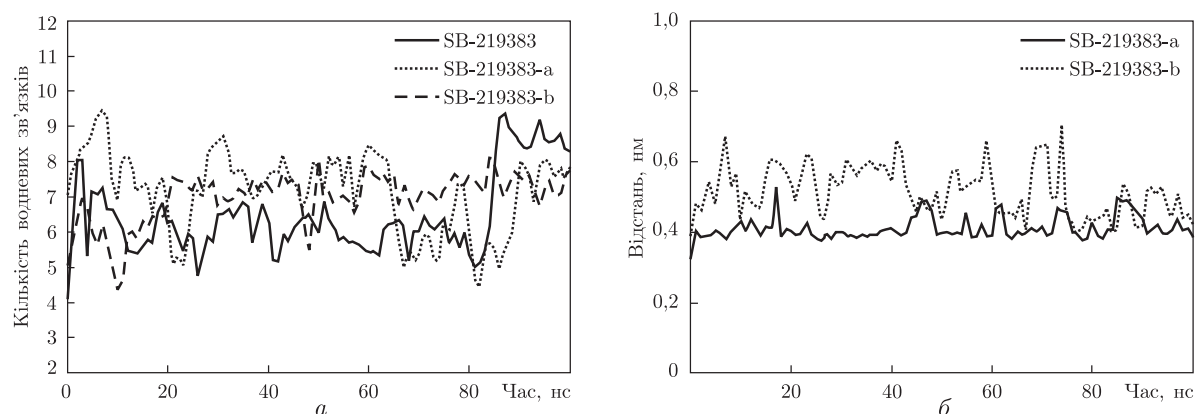


Рис. 4. Середня кількість водневих зв'язків між інгібіторами та активним центром у ході динаміки *MtTyrRS* (а). Відстані між карбоксильними групами нових інгібіторів та Lys231 каталітичного мотиву KFGKS (б). Для інгібітора SB-219383-a значення відстані становить ≈ 4 Å протягом усього часу динаміки *MtTyrRS*, тобто спостерігається безпосередній контакт ван-дер-ваальсових поверхонь

зберігаються до кінця динаміки (100 нс). Після 100 нс динаміки всі інгібітори формують по вісім водневих зв'язків з *MtTyrRS*.

Оскільки важливою для афінності є взаємодія інгібітора з каталітичною петлею ферменту, ми обчислили відстані між карбоксильними групами інгібіторів та Lys231 каталітичного мотиву KFGKS (див. рис. 4, б). На відміну від інгібітора SB-219383-b, для SB-219383-a значення відстані становить ≈ 4 Å протягом усього часу динаміки *MtTyrRS*. Тобто карбоксильна група інгібітора та бокова група Lys231 мають безпосередній контакт ван-дер-ваальсових поверхонь у ході 100 нс динаміки. Інгібітори, що взаємодіють з каталітичною петлею, повинні мати вищу афінність до *TyrRS* бактерій порівняно з *TyrRS* людини [12]. Цей результат дає підстави зробити висновок, що інгібітор SB-219383-a повинен мати краще зв'язування, ніж SB-219383-b.

Таким чином, у результаті проведення дизайну нових інгібіторів *MtTyrRS* на основі відомого SB-219383 нами змодельовано два інгібітори (SB219383-a та SB219383-b), які взаємодіють з каталітичною KMSKS-подібною петлею *MtTyrRS*. Раніше було показано, що такі інгібітори будуть мати вищу афінність до *TyrRS* бактерій порівняно з *TyrRS* людини. За даними порівняльного аналізу взаємодій *MtTyrRS* з інгібітором SB-219383 та побудованими нами інгібіторами, значення енергії взаємодії в активному центрі *MtTyrRS* є нижчими для нових інгібіторів. Аналіз зміни відстані між інгібітором та Lys231 каталітичного мотиву KFGKS показує, що інгібітор SB-219383-a повинен мати краще зв'язування, ніж SB-219383-b.

1. Wang S. F., Yin Y., Qiao F. et al. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of metronidazole derivatives containing piperazine skeleton as potential antibacterial agents // *Bioorg. Med. Chem.* – 2014. – **22**, No 8. – P. 2409–2415.
2. Одинець К. О., Корнелюк О. І. Модель просторової структури тирозил-тРНК синтетази збудника туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis* // *Укр. біохім. журн.* – 2008. – № 5. – С. 36–49.
3. Datt M., Sharma A. Conformational landscapes for KMSKS loop in tyrosyl-tRNA synthetases // *J. Struct. Funct. Genom.* – 2014. – **15**, No 2. – P. 45–61.
4. Bonnefond L., Giegé R., Rudinger-Thirion J. Evolution of the tRNA^{Tyr}/TyrRS aminoacylation systems // *Biochimie.* – 2005. – **87**, No 9–10. – P. 873–883.
5. Мукуляк В. В., Корнелюк О. І. Динамічне формування β -тяжової структури в активному центрі тирозил-тРНК синтетази еубактерії *Mycobacterium tuberculosis* за даними молекулярної динаміки // *Доп. НАН України.* – 2012. – № 5. – С. 158–162.
6. Bonnefond L., Frugier M., Touzé E. et al. Crystal structure of human mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase reveals common and idiosyncratic features // *Structure.* – 2007. – **15**, No 11. – P. 1505–1516.
7. Xiao Z. P., Ma T. W., Liao M. L. et al. Tyrosyl-tRNA synthetase inhibitors as antibacterial agents: synthesis, molecular docking and structure-activity relationship analysis of 3-aryl-4-arylamino-furan-2(5H)-ones // *Eur. J. Med. Chem.* – 2011. – **46**, No 10. – P. 4904–4914.
8. Stefanska A. L., Coates N. J., Mensah L. M. et al. SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. I. Fermentation, isolation and properties // *J. Antibiot. (Tokyo).* – 2000. – **53**, No 4. – P. 345–350.
9. Houge-Frydrych C. S., Readshaw S. A., Bell D. J. SB-219383, a novel tyrosyl tRNA synthetase inhibitor from a *Micromonospora* sp. II. Structure determination // *Ibid.* – 2000. – **53**, No 4. – P. 351–356.
10. Jarvest R. L., Berge J. M., Brown P. et al. Potent synthetic inhibitors of tyrosyl tRNA synthetase derived from C-pyranosyl analogues of SB-219383 // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2001. – **11**, No 5. – P. 715–718.
11. Xiao Z. P., Ouyang H., Wang X. D. et al. 4-alkoxy-3-arylfuran-2(5H)-ones as inhibitors of tyrosyl-tRNA synthetase: synthesis, molecular docking and antibacterial evaluation // *Bioorg. Med. Chem.* – 2011. – **19**, No 13. – P. 3884–3891.
12. Austin J., First E. Comparison of the catalytic roles played by the KMSKS motif in the human and *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetases // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, No 32. – P. 28394–28399.
13. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W. et al. Development and testing of a general AMBER force field // *J. Comput. Chem.* – 2004. – **25**, No 9. – P. 1157–1174.
14. Hess B., Kutzner C., Van Der Spoel D., Lindahl E. GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theory Comput.* – 2008. – **4**, No 3. – P. 435–447.
15. Hornak V., Abel R., Okur O. et al. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters // *Proteins.* – 2006. – **65**, No 3. – P. 712–725.

Інститут високих технологій
Київського національного університету
ім. Тараса Шевченка
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 04.08.2014

В. В. Микуляк, И. Я. Дубей,
член-корреспондент НАН Украины **А. И. Корнелюк**

Дизайн ингибиторов активного центра тирозил-тРНК синтетазы *Mycobacterium tuberculosis* на основе ингибитора SB-219383

Тирозил-тРНК синтетаза *Mycobacterium tuberculosis* (MtTyrRS) является одним из ключевых ферментов синтеза белка на дорибосомном этапе, поэтому его ингибирование должно существенно сдерживать рост патогенных бактерий в организме хозяина. MtTyrRS и TyrRS человека не способны к перекрестному распознаванию и аминоацелированию соответствующих тРНК^{Tyr}, поэтому специфические ингибиторы MtTyrRS должны быть не токсичными для человека. Взаимодействие ингибитора с каталитической KMSKS-подобной петлей MtTyrRS должно существенно повысить его аффинность к ферменту. С учетом этого проведен дизайн новых ингибиторов MtTyrRS на основе структуры известного ингибитора SB-219383. Модификация осуществлялась таким образом, чтобы обеспечить взаимодействие ингибиторов с каталитической петлей фермента. Показано, что смоделированные нами ингибиторы взаимодействуют с каталитической петлей на протяжении всего времени динамики MtTyrRS (100 нс).

V. V. Mykuliak, I. Ya. Dubey,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **A. I. Kornelyuk**

The design of active site inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosyl-tRNA synthetase based on SB-219383 inhibitor

Mycobacterium tuberculosis tyrosyl-tRNA synthetase (MtTyrRS) is one of the key enzymes at the pre-ribosomal protein synthesis step and its inhibition should significantly suppress the growth of pathogenic bacteria in the host body. MtTyrRS and human TyrRS are not able to cross-recognition and aminoacylation of cognate tRNA^{Tyr}, therefore the specific inhibitors of MtTyrRS should not be toxic to human body. Interactions between the inhibitor and the KMSKS-like catalytic loop of MtTyrRS should significantly increase its affinity to the enzyme. We have performed the design of new inhibitors of MtTyrRS based on the structure of the known SB-219383 inhibitor. We modified the inhibitor in order to allow its interactions with the catalytic loop of MtTyrRS. The 100-ns dynamics of MtTyrRS reveals that the proposed inhibitors interact with the catalytic loop during the simulation.