

Біоінформатика

УДК 577.2

Демчук Олег Миколайович

кандидат біологічних наук,
науковий співробітник

Державна установа Інститут харчової біотехнології
та геноміки НАН України

Пятковська Анна Станіславівна

студентка

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Демчук Олег Николайович

кандидат биологических наук,
научный сотрудник

Институт пищевой биотехнологии и
геномики НАН Украины

Пятковская Анна Станиславовна

студентка

Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт имени Игоря Сикорского»

Demchuk Oleh

PhD, Research Fellow

Institute of Food biotechnology and
genomics NAS of Ukraine

Piatkovska Anna

student

National Technical University of Ukraine

"Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute"

ПОШУК НОВИХ ПЕРСПЕКТИВНИХ СПОЛУК-ІНГІБІТОРІВ FTSZ- БІЛКУ VIBRIO CHOLERAЕ МЕТОДОМ ВИСОКОПРОПУСКНОГО СКРИНІНГУ

Анотація: Здійснено пошук нових перспективних антибактеріальних сполук шляхом високопропускового скринінгу на їх спорідненість до FtsZ-білка *Vibrio cholerae*.

Ключові слова: високопропускний скринінг, FtsZ-білок, *Vibrio cholerae*, молекулярна динаміка.

Аннотація: Осуществлен поиск новых перспективных антибактериальных соединений путем высокопропускного скрининга на их сродство к FtsZ-белка *Vibrio cholerae*.

Ключевые слова: высокопропускной скрининг, FtsZ-белок, *Vibrio cholerae*, молекулярная динамика.

Summary: Searching for a new prospective antibacterial compounds by high-throughput screening of affinity to FtsZ-protein *Vibrio cholerae*.

Key words: high productive screening, FtsZ-protein, *Vibrio cholerae*, molecular dynamics.

Одним з перспективних шляхів вирішення проблем стійкості до широко вживаних антибіотиків при лікуванні, зокрема, холери є пошук нових білків-мішеней, однією з яких є FtsZ-білок, що виконує функції поділу бактеріальних клітин, а також розробка нових селективних антибактеріальних препаратів. Для порушення процесу полімеризації протофіламентів FtsZ-білка існує широкий спектр різноманітних сполук.

Метою даної роботи є пошук біоінформаційними методами, а саме високопропускним скринінгом, нових перспективних потенційних інгібіторів FtsZ-білка бактеріального збудника *Vibrio cholerae* (FtsZ_Vc).

Віртуальний скринінг – це обчислювальна процедура, котра передбачає автоматизований перегляд бази даних хімічних сполук з наступним відбором тих із них, для яких прогнозується наявність заданих властивостей. Для здійснення віртуального скринінгу було обрано підхід з використанням високопропускного скринінгу в програмному пакеті Forge V.10. Даний програмний пакет здатен обґрунтувати пріоритетність сполук для подальших досліджень та описує молекули спираючись окрім структури, на їх молекулярні поля [1].

Високопропускний скринінг є процесом тестування великої кількості різноманітних хімічних структур проти цільових захворювань для виявлення "попадань". У порівнянні з традиційними методами скринінгу лікарських засобів, високопропускний скринінг характеризується своєю простотою, швидкістю, низькою вартістю, а також високою ефективністю, приймаючи в якості принципу взаємодію мішень-ліганд, а також призводить до більш високого інформаційного «врожаю» [2].

Основною перевагою даного методу є швидкість відбору: коли з великої бази даних на кілька тисяч чи сотень тисяч хімічних сполук обирається кілька десятків перспективних. В подальшому це дає змогу провести молекулярну динаміку отриманих комплексів у модельній буферній системі за допомогою спеціалізованого програмного пакету Gromacs із застосуванням силового поля charmm27. Та після молекулярної динаміки відібрати необхідну кількість сполук для подальших лабораторних дослідів.

Отже, в результаті досліджень з бібліотеки лігандів для молекулярного скринінгу, яка була створена на базі колекції сполук імідазольного ряду, загалом 2886 індивідуальних сполук, було відібрано 18 сполук (таблиця 1) за співпадінням скелетів при вирівнюванні, маркерів полів та фільтрів програми (таблиця 2), а також таких основних показників, як:

1. Sim - кінцева оцінка для даного результату, яка складається із об'єднаних показників поля і показника форми в співвідношенні, яке вказане в параметрах вирівнювання діалогового вікна обробки (за замовчуванням це 50% кожного результату);
2. AIns - кількість вирівнювань, які були згенеровані для цієї молекули;
3. 2D Sim - двовимірна подібність молекул з еталонними молекулами в метриці, що використовується;
4. SlogP - являє собою хорошу оцінку фактичного logP молекули;

5. TPSA - топологічна полярна поверхня. Постулюється значення TPSA, щоб співвідносити його з транспортними властивостями препарату;
6. Flexibility - міра гнучкості, враховує зв'язки, що повністю обертаються і частково обертаються окремо;
7. Rof5 – число порушень «правила п'яти», що присутнє в цій молекулі. Необхідно звернути увагу, що це визначається як: більше 5 донорів Н-зв'язку (виражені як сума OHS і NHs) MW > 5; Slog P > 5; більше 10 акцепторів Н-зв'язку (виражені як сума Ns і Os) [3].

Таблиця 1 – Розшифровка всіх 18 сполук: назва та формула

F0478-0156	2-Phenyl-2,3-dihydro-1-thia-4a,9-diaza-fluoren-4-one (C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ S)
F0478-0157	(2S)-2-(3-Nitrophenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₆ H ₁₁ N ₃ O ₃ S)
F0478-0208	(2S)-2-(2-Thienyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ S ₂)
F0478-0209	(2S)-2-(2-Furyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂ S)
F0478-0210	2-(4-Fluoro-phenyl)-2,3-dihydro-1-thia-4a,9-diaza-fluoren-4-one (C ₁₆ H ₁₁ FN ₂ O ₂ S)
F0478-0211	(2S)-2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ S)
F0478-0212	(2S)-2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)
F0478-0232	(2S)-2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S)
F0478-0233	(2S)-2-(4-Chlorophenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ S)
F0478-0234	(2S)-2-(4-Methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S)
F0478-0235	(2S)-2-(1-Naphthyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₂₀ H ₁₄ N ₂ O ₂ S)
F0478-0248	1H-Benzotriazol-1-yl(3-chloro-6-methoxy-1-benzothiophen-2-yl)methanone (C ₁₆ H ₁₀ ClN ₃ O ₂ S)
F0478-0310	(2S)-2-(4-Ethoxy-3-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₃ S)
F0478-0365	1H-Benzimidazol-1-yl(3-chloro-6-methoxy-1-benzothiophen-2-yl)methanone (C ₁₇ H ₁₁ ClN ₂ O ₂ S)
F1259-0067	(2S)-2-(4-Ethoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂ S)
F1346-0078	(2E)-3-(4-Fluorophenyl)-1-[2-(methylsulfanyl)-1H-benzimidazol-1-yl]-2-propen-

	1-one (C17H13FN2OS)
F1651-0076	(2S)-2-(3-Fluorophenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C16H11FN2OS)
F1651-0081	(2S)-2-(3,4-Dichlorophenyl)-2,3-dihydro-4H-[1,3]thiazino[3,2-a]benzimidazol-4-one (C16H10Cl2N2OS)

Таблиця 2 – Сполуки, відібрані в результаті високопропускного скринінгу за допомогою програмного пакету Forge

Title	#Atoms	MW	Sim	Alns	2D Sim	SlogP	TPSA	Flexibility	Rof5
F0478-0156	20	280,3	0,811	8	0,508	3,9	34,9	0,6	0
F0478-0157	23	325,3	0,799	9	0,486	3,7	80,7	0,9	0
F0478-0208	19	286,4	0,813	9	0,461	4	34,9	0,6	0
F0478-0209	19	270,3	0,791	10	0,485	2,9	48	0,6	0
F0478-0210	21	298,3	0,822	10	0,553	4,3	34,9	0,6	0
F0478-0211	23	324,4	0,819	10	0,769	3,6	53,3	0,6	0
F0478-0212	26	370,4	0,772	9	0,742	3,9	62,6	2,1	0
F0478-0232	24	340,4	0,784	10	1	3,9	53,3	1,6	0
F0478-0233	21	314,8	0,836	10	0,553	4,6	34,9	0,6	0
F0478-0234	22	310,4	0,798	10	0,73	3,9	44,1	1,1	0
F0478-0235	24	330,4	0,757	10	0,445	5,1	34,9	0,6	1
F0478-0248	23	343,8	0,76	10	0,438	4	57	1	0
F0478-0310	25	354,4	0,763	9	0,806	4,3	53,3	2,6	0
F0478-0365	23	342,8	0,757	8	0,434	4,6	44,1	1	0
F1259-0067	23	324,4	0,79	10	0,613	4,3	44,1	2,1	0
F1346-0078	22	312,4	0,753	9	0,363	4,4	34,9	1,8	0
F1651-0076	21	298,4	0,814	10	0,548	4,3	34,9	0,6	0
F1651-0081	22	347,9	0,804	9	0,599	5,3	34,9	0,6	1

Сайтом зв'язування еталонної сполуки з білком FtsZ_Vc обрано атом зі складу амінокислотного залишку, розташованого по центру області, яка аналогічна сайту зв'язування сполуки PC190723 з FtsZ-білком *S.aureus* subsp. *aureus* Mu50. Для потенційного сайту зв'язування складі FtsZ_Vc таким атомом виявився атом азоту ND2 амінокислотного залишку Asn192.

Під час обрахунків молекулярної динаміки за допомогою модуля «mdrun» програмного пакету «Gromacs 4.5.4» фіксувались величини енергетичних компонент, а саме кулонівських (електростатичних, $V_{l-s\ el}$) та Леннард-Джонсівських ($V_{l-s\ LJ}$) взаємодій, як ліганду в складі комплексу з білком, так і ліганду у водному оточенні [4]. Енергію зв'язування ліганду з білком обраховували за формулою:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha(\langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_{\text{p}} - \langle V_{\text{L-s LJ}} \rangle_{\text{w}}) + \beta(\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{p}} - \langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{w}}) \text{ [5]}.$$

Враховуючи той факт, що в даній формулі від значень V ліганду в комплексі віднімаються відповідні значення V ліганду в чистому водному оточенні, то $\Delta G_{\text{bind}} > 0$ свідчить про те, що енергія ліганду в воді є нижчою, ніж у складі комплексу з FtsZ_Vc, перебування в якому, відповідно, не є енергетично вигіднішим за перебування в чистому водному середовищі. І навпаки, $\Delta G_{\text{bind}} < 0$ вказує на більш релаксовану конформацію ліганда в комплексі з білком у порівнянні з конформацією в чистому водному оточенні. Наближення показника ΔG_{bind} до нуля свідчить про те, що у складі комплексу з білком ліганд набуває такого конформаційного стану, який подібний до його ненапруженої конформації у водному середовищі. Обраховані значення коливань ΔG_{bind} похідних бензімідазолів на поверхні FtsZ_Vc представлено на рис. 1 у вигляді ліній логарифмічних трендів відповідних графіків.

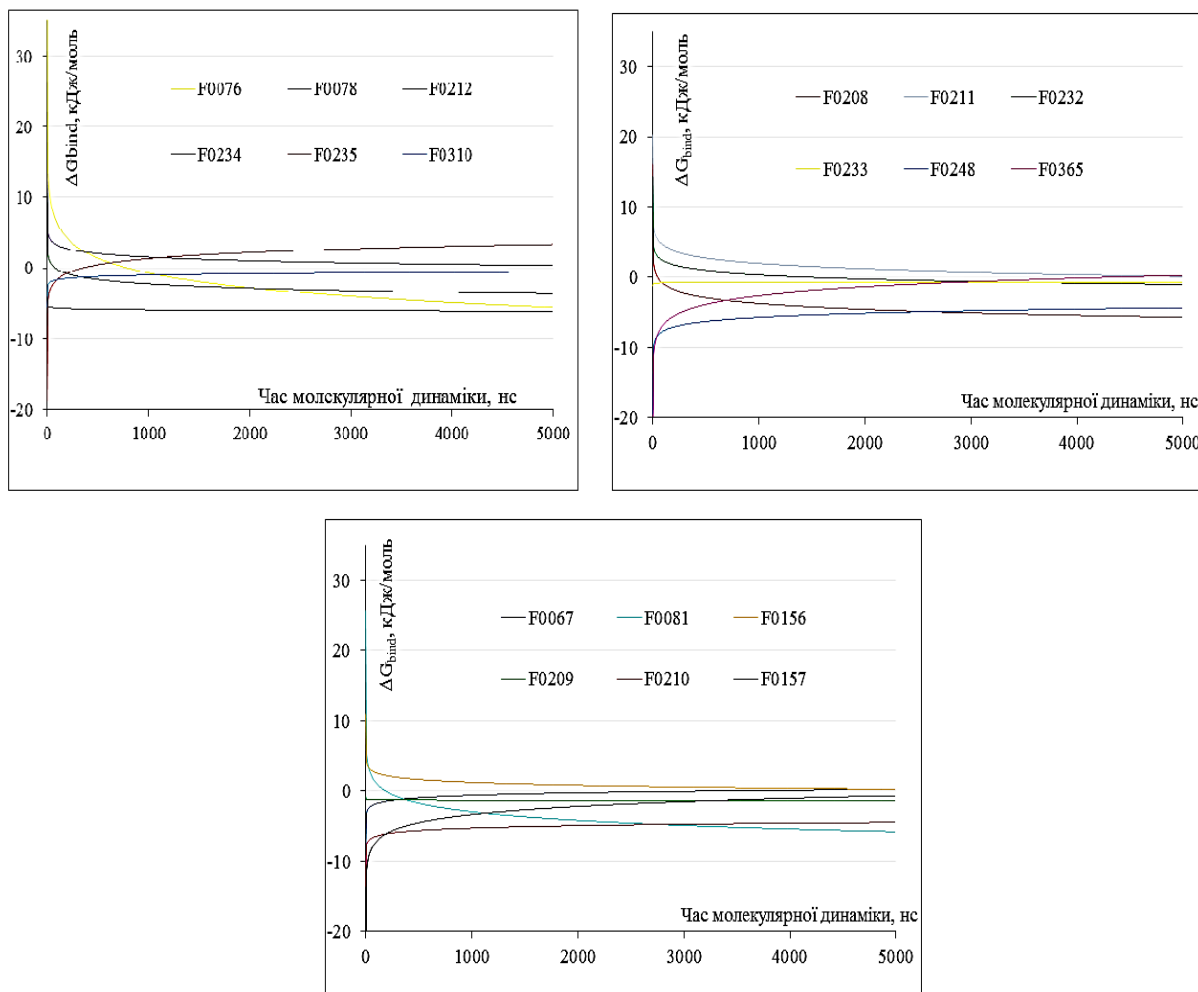


Рис. 1 – Логарифмічні тренди коливання значень ΔG_{bind} для похідних імідазолу на поверхні білку FtsZ_Vc [розробка автора]

Аналіз наведених даних свідчить, що при розташуванні лігандів у встановленому потенційному сайті енергетично не вигідні конформації виявляються у лігандів F0478-0235, F0478-0234, F0478-0210, F0478-0209, F0478-0233 та F0478-0248. Однак до близько-нульових позитивних значень опускаються тренди F1259-0067, F0478-0156, F0478-02310, F0478-0211, F0478-0365 і F1346-0078, що свідчить про набуття комфортного розташування зазначених лігандів у сайті, та піднімається лінія тренду у випадку F0478-0210, F0478-0310 вказуючи на погіршення конформаційного стану даного ліганду під час молекулярної динаміки.

Від'ємні кінцеві значення рівнів ΔG_{bind} демонструє молекулярна динаміка для F0478-0157, F0478-0232, F1651-0076, F0478-0208 та F1651-0081, що однозначно говорить про більшу релаксацію даних двох сполук у складі ліганд-білкового комплексу в порівнянні з водним середовищем. При цьому слід зауважити, що у випадку F0478-0232 та F0478-0157 лінія тренду підіймається до нульової відмітки, а у випадку інших трьох сполук – опускається за неї. Це, в свою чергу, свідчить про високу потенційну здатність останніх трьох низькомолекулярних сполук виявляти афінні властивості при зв'язуванні з FtsZ-білком холерного вібріону в сайті зв'язування.

Таким чином, проведений аналіз молекулярної динаміки ліганд-білкових комплексів дозволяє нам обрати сполуки F1651-0076 ((2S)-2-(3-Фторфеніл)-2,3-дигідро-4Н-[1,3]тіазино[3,2-а]бензімідазол-4-он), F0478-0208 ((2S)-2-(2-Тіеніл)-2,3-дигідро-4Н-[1,3] тіазино[3,2-а]бензімідазол -4-он) та F1651-0081 ((2S)-2-(3,4-Дихлорфеніл)-2,3-дигідро-4Н-[1,3]тіазино[3,2-а]бензімідазол-4-он) як такі, що є потенційними інгібіторами FtsZ_Vc. Також дані сполуки є гарними попередниками для подальшого раціонального дизайну нових інгібіторів FtsZ-білків патогенних бактерій і можуть знайти застосування як антибактеріальні засоби.

Література:

1. Cheeseright T1, Mackey Phd M, Rose Phd S, Vinter Phd A. Expert Opin Drug Discov. 2007 Jan;2(1):131-44. doi: 10.1517/17460441.2.1.131. Molecular field technology applied to virtual screening and finding the bioactive conformation.
2. Liu B., Li S., Hu J., Am J. Pharmacogenomics. 2004;4(4):263-76. Technological advances in high-throughput screening.
3. Forge V.10.4 (september, 2015), cresset-group.com, - P. 18-42.

4. Hess B., Kutzner C. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation / J. Chem. Theory Comput.- 2008. - Vol. 4, - P. 435–447.
5. Almlöf M., B.O. Brandsdal, and J. Aqvist, Binding affinity prediction with different force fields: examination of the linear interaction energy method / M. Almlöf, B.O. Brandsdal, J. Aqvist / J. Comput. Chem. – 2004. – Vol. 25, № 10. – P. 1242-1254.