

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Гущина Ирина Владимировна

**Разработка сульфозамещенных ингибиторов
транскетолазы и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1
с использованием методов биоинформатики
и молекулярного моделирования**

Специальность 03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научные руководители: ***Нилов Дмитрий Константинович,***
кандидат химических наук, старший научный
сотрудник НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова

Швядас Витаутас-Юозапас Каятоно,
доктор химических наук, профессор
факультета биоинженерии и биоинформатики
МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты: ***Ходырева Светлана Николаевна,***
доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Шайтан Константин Вольдемарович,
доктор физико-математических наук, профессор
кафедры биоинженерии биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Щербинин Дмитрий Сергеевич,
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник Института трансляционной медицины
РНИМУ имени Н.И. Пирогова

Защита диссертации состоится 30 июня 2021 года в 16:30 на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 221.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/344127172/>

Автореферат разослан «___» мая 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Шаповалова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сульфонаты являются перспективным классом соединений для дизайна низкомолекулярных ингибиторов ферментов. Сульфозаместитель можно рассматривать в качестве изотерического аналога фосфатной группы, входящей в состав различных природных субстратов и коферментов. В базе данных Protein Data Bank представлены структуры уже более ста фермент-ингибиторных комплексов с сульфонатами, большая часть которых была получена недавно. В рамках представленной работы была исследована возможность создания эффективных сульфозамещенных ингибиторов, действующих в отношении двух терапевтически важных мишеней: транскетолазы *Mycobacterium tuberculosis* (ТК) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека (ТДФ1).

ТК – ключевой фермент пентозофосфатного пути метаболизма углеводов у бактерий, его важность для жизнедеятельности возбудителя туберкулеза *M. tuberculosis* была доказана путем подавления экспрессии. Несмотря на то, что ингибирование ТК представляет большой интерес для терапии туберкулеза, бактериальный фермент изучен слабо по сравнению с гомологичными белками дрожжей и человека. К настоящему времени для подавления его активности не было предложено ни одного ингибитора.

ТДФ1 – фермент репарации ДНК и перспективная мишень для лечения онкологических заболеваний. Ингибирование ферментов репарации, таких как ТДФ1, способно усиливать эффект ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов и способствовать преодолению лекарственной устойчивости. Несмотря на обширные исследования в этой области, существующие ингибиторы ТДФ1 пока не удовлетворяют требованиям клинического применения, и необходим поиск новых эффективных и безопасных соединений.

Кофермент ТК (тиаминдифосфат) и субстрат ТДФ1 содержат фосфатные группы, которые образуют ключевые водородные связи с активным центром.

Данные взаимодействия гипотетически могут быть реализованы сульфогруппой в составе конкурентного ингибитора.

Степень разработанности темы исследования

Наиболее подробно строение и механизм ТК исследованы для фермента из дрожжей, являющегося удобным модельным объектом, в то время как свойства ТК из *M. tuberculosis* на данный момент малоизучены, а ее единственная кристаллическая структура была получена в 2012 году. В литературе не описано ни одного ингибитора ТК из *M. tuberculosis*, однако известен ряд ингибиторов ТК человека (например, окситиамин). Вопросы селективности ингибиторов ТК в отношении различных организмов проработаны весьма слабо.

Для ТДФ1 человека получен набор кристаллических структур, что позволило подробно изучить каталитический механизм. Наиболее сильные ингибиторы ванадат- и вольфрамат-ионы токсичны для клеток и использовались в целях рентгеноструктурного анализа. Несколько классов ингибиторов ТДФ1 было обнаружено путем *in vitro* скрининга (например, производные усниновой кислоты), однако соответствующие структуры фермент-ингибиторных комплексов неизвестны, и не вполне понятна природа взаимодействий соединений с остатками активного центра.

Цель и задачи работы

Целью проведенного исследования была разработка новых сульфозамещенных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека, являющихся важными мишенями в терапии социально значимых заболеваний. Для этого был осуществлен компьютерный скрининг с использованием методов биоинформатики, молекулярного моделирования и алгоритмов структурной фильтрации. Для достижения данной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. На основе кристаллических структур построить молекулярные модели ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека, предназначенные для компьютерного

поиска ингибиторов.

2. Провести биоинформатический анализ ТК из разных организмов для выявления структурных особенностей активного центра, важных для поиска селективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis*.
3. Проанализировать строение фермент-субстратного комплекса ТДФ1 для выявления участков связывания в активном центре, важных для поиска новых ингибиторов.
4. Разработать структурные критерии для отбора эффективных ингибиторов ТК и ТДФ1 в ходе компьютерного скрининга, а также необходимое для структурной фильтрации программное обеспечение.
5. Сконструировать библиотеки сульфозамещенных низкомолекулярных соединений и осуществить их компьютерный скрининг для отбора перспективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являлись белки ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека – важные мишени для терапии социально значимых заболеваний. Предметом исследования явилась способность белков-мишеней образовывать специфическое взаимодействие с низкомолекулярными сульфозамещенными соединениями, приводящее к подавлению ферментативной активности.

Научная новизна

В ходе выполнения работы разработан уникальный алгоритм структурной фильтрации позиций, полученных методом докинга, для идентификации новых эффективных ингибиторов ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека. Выявлены структурные особенности активного центра ТК *M. tuberculosis*, важные для дизайна селективных ингибиторов; идентифицированы первые ингибиторы бактериального фермента из класса сульфонатов. Установлены участки активного центра ТДФ1 человека, наиболее важные для взаимодействия с

субстратом и ингибиторами; идентифицированы новые сульфозамещенные ингибиторы, связывающиеся на данных участках.

Теоретическая и практическая значимость

Установленные в результате работы особенности строения активных центров ТК *M. tuberculosis* и ТДФ1 человека позволяют лучше понять механизм взаимодействия данных белков с субстратами и ингибиторами. Поскольку ТК является перспективной мишенью в терапии туберкулеза, а ТДФ1 – в противоопухолевой терапии, предпринятая разработка ингибиторов будет способствовать появлению новых лекарственных средств борьбы с данными социально значимыми заболеваниями.

Методология и методы исследования

Построение молекулярных моделей белков ТК и ТДФ1 для скрининга осуществляли на основе кристаллических структур в пакетах AmberTools и Amber (<https://ambermd.org>). Компьютерный скрининг ингибиторов осуществляли с использованием пакета ACD Labs (www.acdlabs.com), программы для докинга Lead Finder (www.moltech.ru), а также с помощью web-сервера структурной фильтрации vsFilt (<https://biokinet3.belozersky.msu.ru/vsfilt>), разработанного автором для решения задач работы. Алгоритм vsFilt детектирует различные типы взаимодействий между тестируемой молекулой и белком-мишенью в смоделированном комплексе (водородные связи, ионные взаимодействия и др.) и позволяет отбирать лекарствовподобные соединения, способные к наиболее эффективному и специфическому связыванию. Экспериментальное исследование активности ингибиторов, предсказанных автором, осуществлялось в отношении очищенных белков в НИИ физико-химической биологии имени Белозерского МГУ и Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а также в отношении штамма микобактерий в Центральном научно-исследовательском институте туберкулеза.

Положения, выносимые на защиту

1. В активном центре ТК *M. tuberculosis* идентифицирован гидрофобный кластер Ile211-Leu402-Phe464, отсутствующий в ТК человека, что обуславливает возможность разработки селективных ингибиторов.
2. Активный центр ТДФ1 содержит два обособленных участка, важных для связывания субстрата и ингибиторов: участок фосфотирозина и участок олигонуклеотида.
3. С помощью компьютерного скрининга и структурной фильтрации обнаружены ингибиторы ТК *M. tuberculosis*, содержащие сульфогруппу в качестве структурного аналога пиррофосфатной группы кофермента.
4. С помощью компьютерного скрининга и структурной фильтрации выявлены новые ингибиторы ТДФ1 человека, содержащие сульфогруппу в качестве аналога фосфатной группы субстрата.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методик моделирования и компьютерного скрининга, а также публикацией результатов в рецензируемых научных журналах международного уровня.

Личный вклад автора в проведение исследования

Основные результаты работы получены самим автором. Личный вклад заключается в следующем: анализ литературных данных, планирование и проведение компьютерных экспериментов, анализ полученных данных, представление результатов на конференциях, подготовка научных публикаций. Экспериментальное подтверждение активности предсказанных автором ингибиторов, дополняющее расчетные работы, было осуществлено специалистами НИИ физико-химической биологии имени Белозерского МГУ, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и

Центрального научно-исследовательского института туберкулёза.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базе данных WoS (в том числе 3 статьи в высокорейтинговых журналах квартиля Q1). Кроме того, получен патент на изобретение.

Апробация работы

Часть материалов диссертации была защищена в 2019 году в рамках НКР, подготовленной во время обучения в аспирантуре факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы были представлены на международных конференциях: «Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB)» (Москва, 2015), «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS)» (Новосибирск, 2016), «Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications» (Истра, 2017), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (BIOTECHN WORLD)» (Москва, 2018), 43-ий Конгресс FEBS (Прага, 2018), конференция «Chemical Biology» (Хайдельберг, 2018), IV Междисциплинарный симпозиум по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике «МОБИ-ХимФарма» (Новый Свет, 2018), 4-ая Российская конференция по медицинской химии «МедХим-2019» (Екатеринбург, 2019), XXVI Симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» (Москва, 2020).

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 152 ссылки. Работа изложена на 110 страницах текста, содержит 15 таблиц и 34 рисунка.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Список сокращений

ТДФ1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; ТК – транскетолаза; КМ – квантово-механический; ММ – молекулярно-механический; ΔG^{calc} – расчетная свободная энергия связывания; IC_{50} – концентрация ингибитора, уменьшающая активность фермента на 50%; Top1 – топоизомераза 1.

Разработка ингибиторов транскетолазы

ТК катализирует двухстадийную реакцию переноса двухуглеродного фрагмента с кетосахаров (субстратов-доноров) на альдозы (субстраты-акцепторы) в пентозофосфатном пути метаболизма углеводов. Важность активности ТК для жизнедеятельности *M. tuberculosis* была продемонстрирована путем подавления экспрессии; данный фермент является перспективной мишенью для разработки новых лекарств против туберкулеза. В активном центре ТК располагается кофермент тиаминдифосфат и ион магния, в координировании которого принимает участие пирофосфатная группа кофермента. В ходе диссертационной работы была предпринята разработка ингибиторов ТК *M. tuberculosis*, содержащих сульфогруппу – структурный миметик пирофосфата, способную участвовать в координации магния и вступать во взаимодействия с донорами водородных связей в активном центре.

Молекулярное моделирование и биоинформатический анализ транскетолаз

В результате пространственного наложения доступных структур ТК, а также построения структурно-опосредованного выравнивания последовательностей ТК микобактерий, дрожжей и человека были изучены остатки активного центра, взаимодействующие с коферментом тиаминдифосфатом и субстратом. Было установлено, что большинство из этих остатков консервативны по структуре или по функции во всех трех организмах (рис. 1). Несколько неконсервативных остатков формируют дополнительные взаимодействия с тиаминдифосфатом в ТК человека, что может обуславливать повышенное сродство к коферменту.

Важной особенностью структурной организации ТК из разных организмов оказалось наличие кластера из трех гидрофобных остатков (Phe-Leu-Phe) на границе участков связывания кофермента и субстрата в ТК дрожжей и бактерий, который отсутствует у ТК человека. Остатки Phe211 и Leu402 *M. tuberculosis* заменены на полярные остатки Gln189 и Thr342 в ТК человека. Остаток Phe464/442/389 (бактерия/дрожжи/человек) консервативен, однако структурное наложение выявило поворот плоскости бензольного кольца в ТК человека по сравнению с бактериальным ферментом (рис. 2).

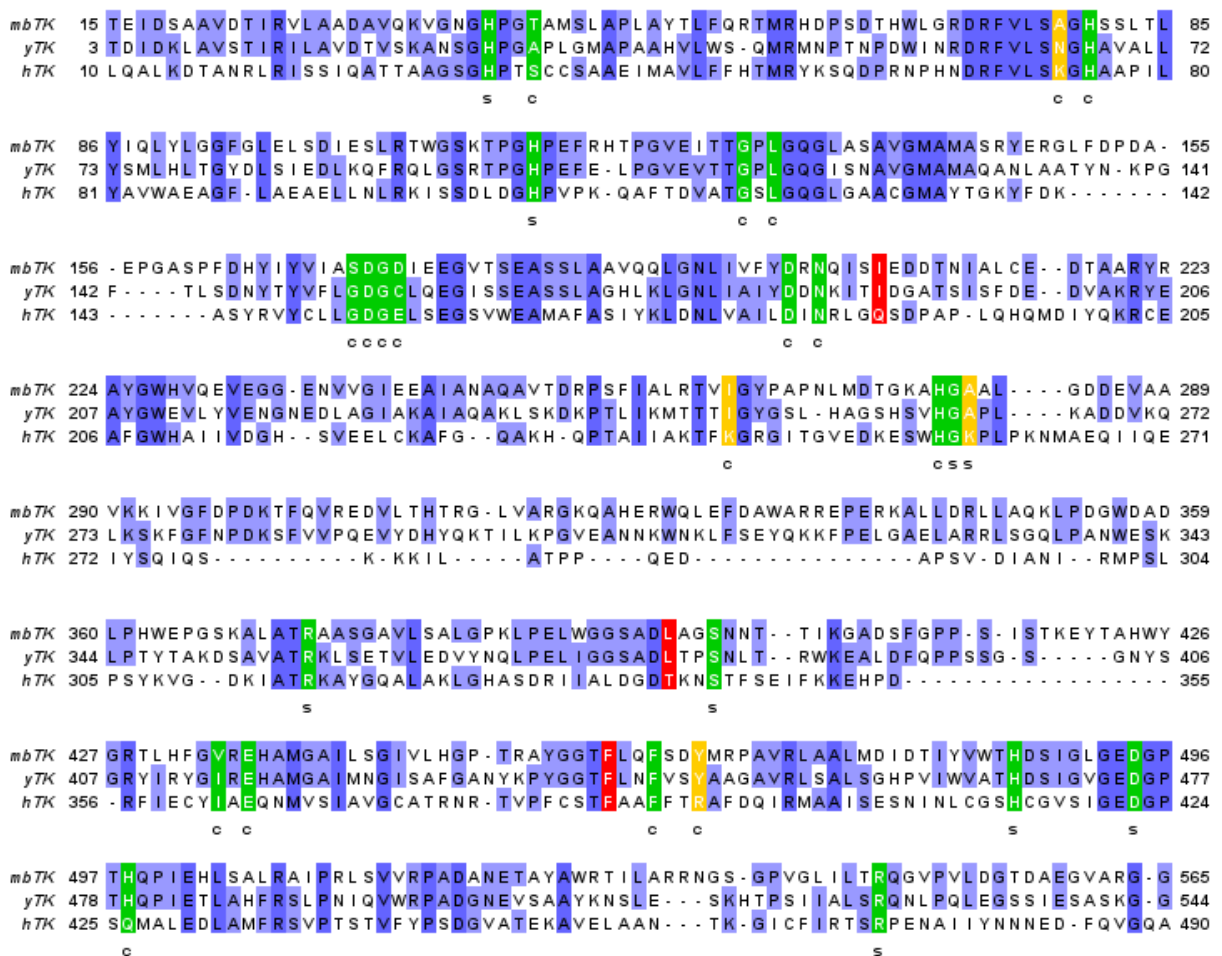


Рис. 1. Выравнивание последовательностей ТК микобактерий (*M. tuberculosis*), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) и человека. Позиции остатков активного центра, взаимодействующих с коферментом (с) или субстратом (s) выделены зеленым (остатки, консервативные по структуре или функции) или желтым (неконсервативные остатки). Красным выделены позиции остатков гидрофобного кластера, характерного для *M. tuberculosis* и *S. cerevisiae*.

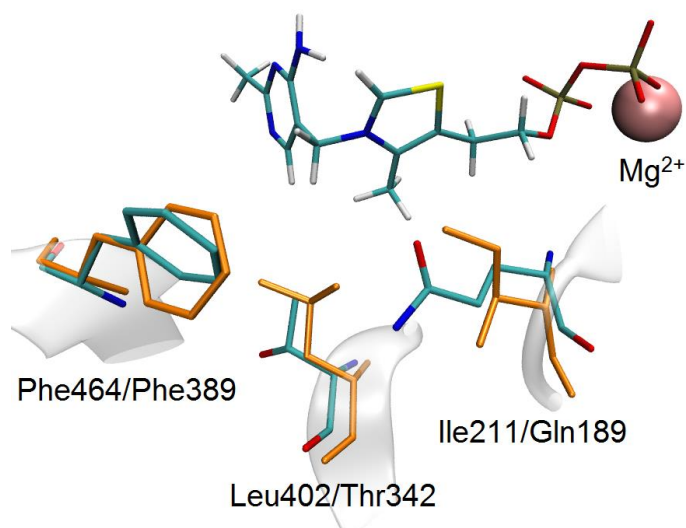


Рис. 2. Кластер гидрофобных остатков Ile211-Leu402-Phe464 на границе участков связывания кофермента и субстрата, характерный для ТК *M. tuberculosis*, но отсутствующий у человека. Остатки бактериальной ТК показаны оранжевым цветом, а ТК человека – раскрашены по типам атомов. Также показаны кофермент тиаминдифосфат и ион магния.

Первичный скрининг ингибиторов транскетолазы

Для поиска ингибиторов использовали молекулярную модель ТК *M. tuberculosis*, сконструированную на основе кристаллической структуры 3rim. Для скрининга был выбран участок связывания кофермента тиаминдифосфата в активном центре ТК. Набор соединений для скрининга был сконструирован на основе коммерческой библиотеки Vitas-M (<https://vitasmlab.biz>). Библиотеку отфильтровали по правилу Липинского, после чего извлекли соединения, содержащие сульфогруппу (всего 320 веществ).

После докинга соединений в активный центр ТК осуществили структурную фильтрацию полученных позиций с помощью разработанной автором программы vsFilt. В качестве структурного критерия было выбрано взаимодействие сульфогруппы с ионом магния и водородные связи с остатками His85 и His283, участвующими в связывании пирофосфатной группы кофермента. Таким образом, отрицательно заряженная сульфогруппа рассматривалась в качестве миметика пирофосфата. В результате для экспериментальной проверки отобрали

несколько соединений, образующих наиболее выгодные взаимодействия. Исследование ингибиторной активности было осуществлено в отделе биокинетики НИИ ФХБ им. Белозерского с использованием модельного фермента из *S. cerevisiae*.

Наибольшую ингибиторную активность показало вещество STK045765. В данном соединении заряженная (фурансульфонатная) и гидрофобная группы соединены посредством линкера. Анализ модельной позиции STK045765, представленной на рис. 3, показал, что гидрофобная группа образует взаимодействие с кластером Ile211-Leu402-Phe464 на границе участков связывания кофермента и субстрата. Докинг в модель белка человека показал, что STK045765 занимает одинаковую позицию в активном центре ТК бактерии и человека. Однако в связи с аминокислотными заменами в белке человека утрачивается эффективное взаимодействие с гидрофобным кластером (в частности, остаток Gln189 обращен к ингибитору полярной группой). Таким образом, взаимодействие с кластером Ile211-Leu402-Phe464 в ТК *M. tuberculosis* не только повышает эффективность ингибирования, но и способно обуславливать селективность к бактериальному ферменту.

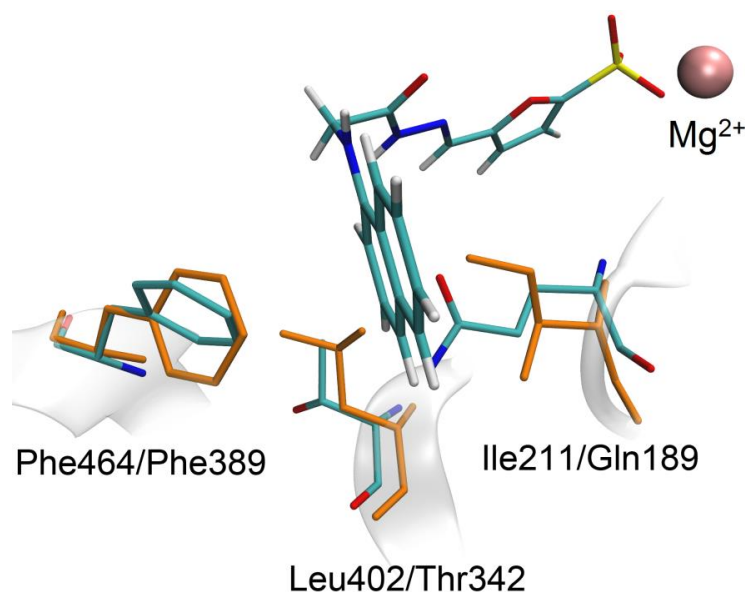


Рис. 3. Предсказанная позиция ингибитора STK045765 в активном центре ТК микобактерий и человека. Остатки ТК *M. tuberculosis* показаны оранжевым цветом, а ТК человека – раскрашены по типам атомов.

Вторичный скрининг ингибиторов транскетолазы

Для проведения вторичного скрининга из библиотеки Vitas-M были извлечены аналоги STK045765 с различными вариантами гидрофобной части (всего 64 соединения) После их докинга в модель бактериальной ТК была проведена визуальная оценка наличия оптимального взаимодействия гидрофобной группы с остатками Pe211-Leu402-Phe464. В результате было отобрано несколько новых соединений, большинство из которых показало активность в отношении дрожжевого фермента. Это способствовало разработке более сложной экспериментальной системы на основе бактериальной ТК в НИИ ФХБ им. Белозерского.

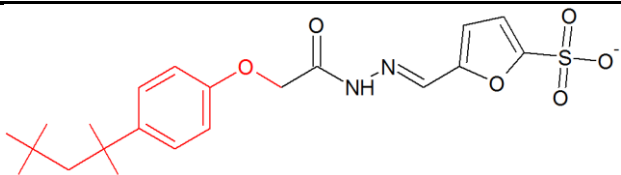
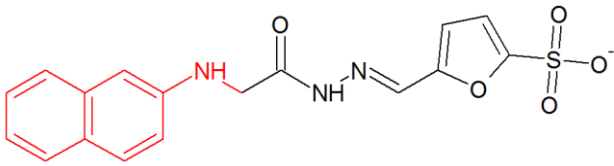
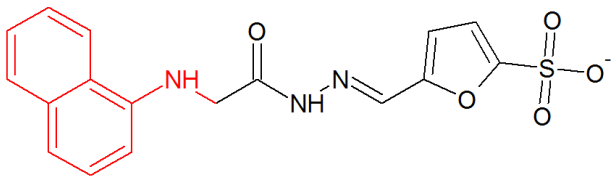
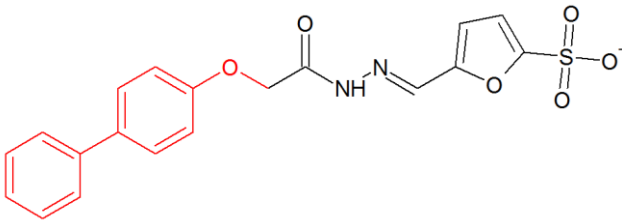
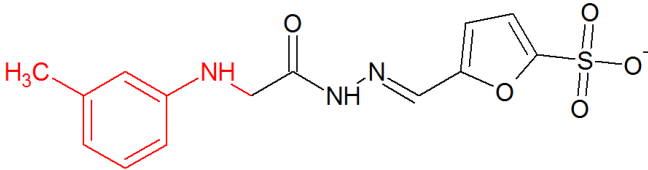
Экспериментальная проверка в отношении очищенного фермента из *M. tuberculosis* показала, что наиболее эффективным ингибитором является соединение STK106769, которое в концентрации 150 мкМ полностью подавляет ферментативную активность (табл. 1). Значение IC_{50} для данного ингибитора составило 7 мкМ. Наличие разветвленного заместителя $-CH(CH_3)_2-CH_2Bu^t$ в структуре этого соединения обеспечивает эффективное связывания на участке Pe211-Leu402-Phe464 (рис. 4).

В ЦНИИ туберкулеза была исследована противотуберкулезная активность STK106769, STK394513 и STK045765 в отношении штамма H37Rv. Подавление роста *M. tuberculosis* в присутствии ингибитора в концентрации 5 мМ составило 92, 97 и 97% соответственно; по результатам исследований был получен патент.

Гидрофобная группа STK106769 обеспечивает селективность действия в отношении ТК *M. tuberculosis*, однако в то же время существенно ограничивает растворимость. Для исследования возможности улучшения растворимости осуществили моделирование соединений на основе структуры STK106769 путем присоединения гидрофильных заместителей к группе $-CH(CH_3)_2-CH_2Bu^t$, ориентированной в сторону растворителя (всего 26 соединений с дополнительными гидроксильными или аминогруппами). Докинг показал, что внесенные модификации не влияют на положение базовой структуры

ингибитора, а в некоторых случаях образуются дополнительные водородные связи с остатками на выходе из активного центра (рис. 4). Таким образом, предложенный путь оптимизации ингибиторов ТК может являться перспективным способом повышения их растворимости без снижения эффективности связывания.

Табл. 1. Сульфозамещенные соединения, обнаруженные в результате скрининга и проявившие наибольший ингибиторный эффект в отношении очищенной ТК из *M. tuberculosis*. ¹Концентрация ингибитора – 150 мкМ.

ID	Структура	ΔG^{calc} , ккал/ моль	% ингиби- рования ¹
STK106769		-10,2	100
STK394513		-7,8	41
STK045765		-6,9	29
STK105664		-9,6	26
STK028127		-8,0	16

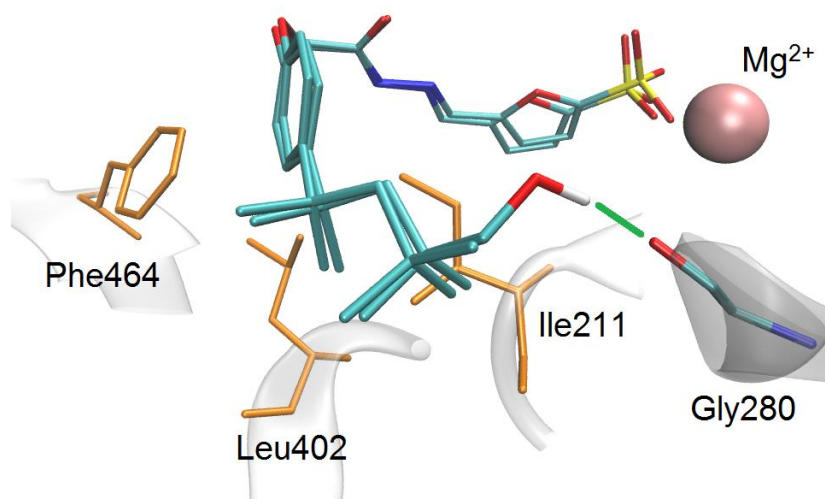


Рис. 4. Предсказанная позиция соединения STK106769 и его гидроксильного производного в активном центре ТК *M. tuberculosis*. Гидрофобный кластер Ile211-Leu402-Phe464 показан оранжевым цветом, зеленым показана дополнительная водородная связь солюбилизирующего заместителя.

Разработка ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

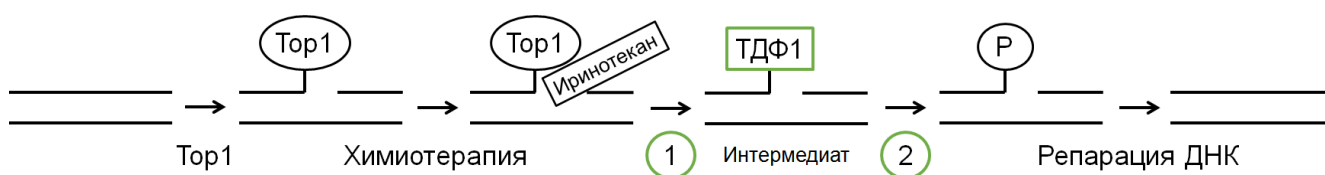


Рис. 5. Роль ТДФ1 в репарации ДНК и противоопухолевой химиотерапии с помощью препаратов типа иринотекан. Отмечены два возможных пути для ингибирования ТДФ1: 1 – конкурентное ингибирование путем связывания с апоферментом ТДФ1, 2 – бесконкурентное ингибирование путем связывания с интермедиатом ТДФ1.

ТДФ1 является ферментом репарации ДНК человека, который расщепляет комплексы ДНК с топоизомеразой (Top1) по ковалентной связи остатка тирозина с 3'-концевым фосфатом. Такие комплексы могут накапливаться в процессе репликации и транскрипции в результате различных повреждений ДНК, а также под действием ингибиторов Top1, таких как химиопрепарат иринотекан (рис. 5). Поэтому ТДФ1 рассматривается в качестве перспективной противоопухолевой мишени, ингибиторы которой могли бы усиливать эффект традиционной

химиотерапии и способствовать преодолению лекарственной устойчивости. Субстратом ТДФ1 служит предварительно подвергшийся протеолизу комплекс Top1-ДНК, в котором олигопептидный фрагмент Top1 соединен с ДНК через остаток фосфотирозина. В ходе работы была предпринята разработка ингибиторов ТДФ1, содержащих сульфогруппу – структурный миметик фосфатной группы фосфотирозина.

Молекулярное моделирование тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

В литературе рассматривается два возможных пути подавления активности ТДФ1 человека: ингибирование связывания субстрата и ингибирование гидролиза интермедиата (рис. 5). В связи с этим, на основе кристаллической структуры 1пор были построены следующие модели белка: апофермент, фермент-субстратный комплекс и ковалентный интермедиат (рис. 6). Для симуляции образования интермедиата постепенно уменьшали расстояние между 3'-фосфатной группой и имидазольным кольцом His263 (нуклеофил) в фермент-субстратном комплексе.

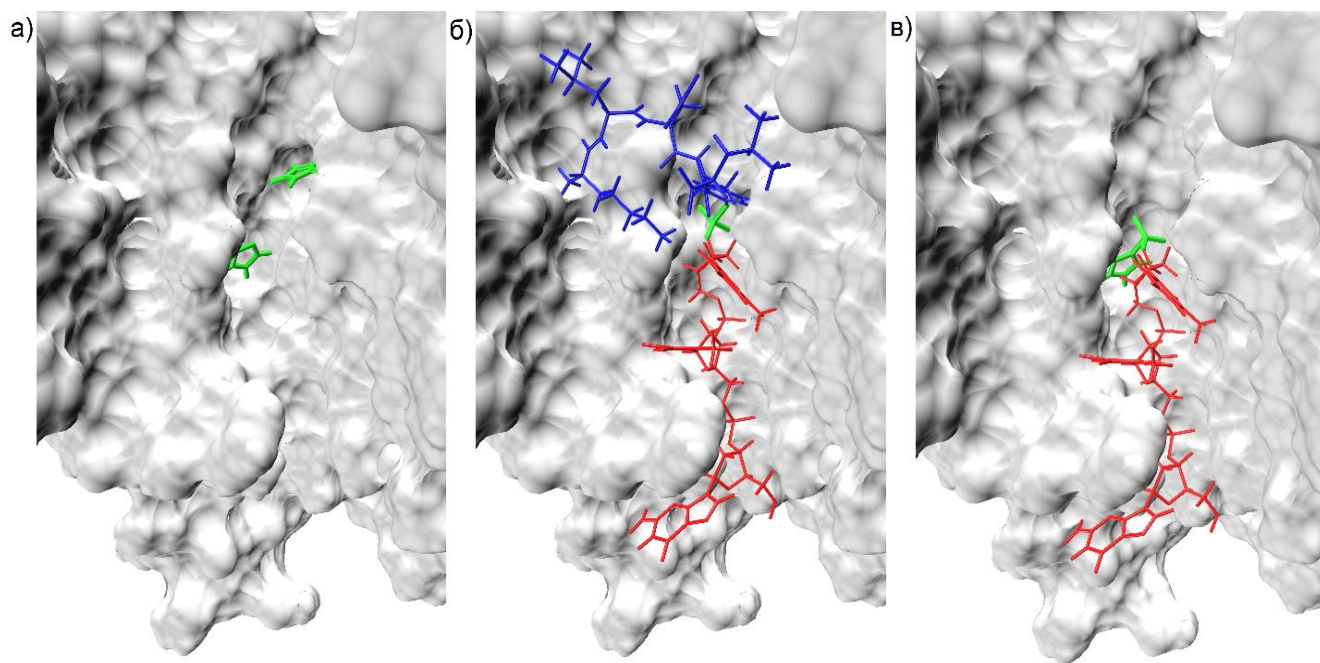
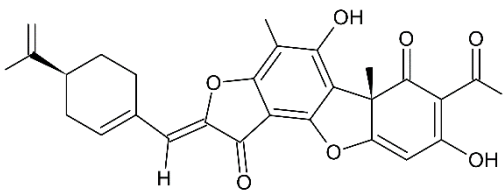
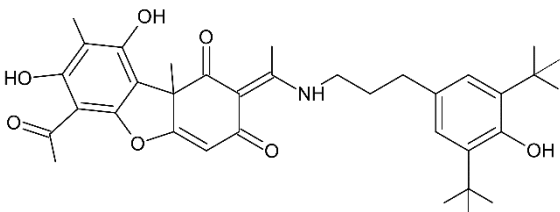


Рис. 6. Полученные молекулярные модели ТДФ1 человека: (а) апофермент, (б) фермент-субстратный комплекс, (в) ковалентный интермедиат. Синим показана олигопептидная часть субстрата, красным – олигонуклеотидная. Каталитические остатки гистидина и атакуемая 3'-фосфатная группа показаны зеленым.

Адекватность полученных моделей ТДФ1 оценивали путем докинга двух классов известных ингибиторов, разработанных при участии сотрудников ИХБФМ СО РАН: терпеноидные производные усниновой кислоты и енамины усниновой кислоты (табл. 2). Эти соединения докировали в модели апофермента и ковалентного интермедиата ТДФ1.

Табл. 2. Наиболее активные ингибиторы ТДФ1 среди производных усниновой кислоты.

	Химическая структура	ΔG^{calc} , ккал/моль	IC ₅₀ , мкМ
Терпеноидное производное		-11,9	0,33
Енаминовое производное		-10,4	0,16

Моделирование показано, что терпеноидные производные усниновой кислоты предпочтительно связываются в активном центре апоформы белка, в то время как енамины предположительно являются бесконкурентными ингибиторами ТДФ1, связываясь с ковалентным интермедиатом в полости по соседству с активным центром (рис. 7). Данные моделирования согласуются с экспериментальными результатами по механизму ингибирования, а предсказанные позиции соединений характеризуются выгодными взаимодействиями с белком, что подтверждает пригодность примененной вычислительной методики.

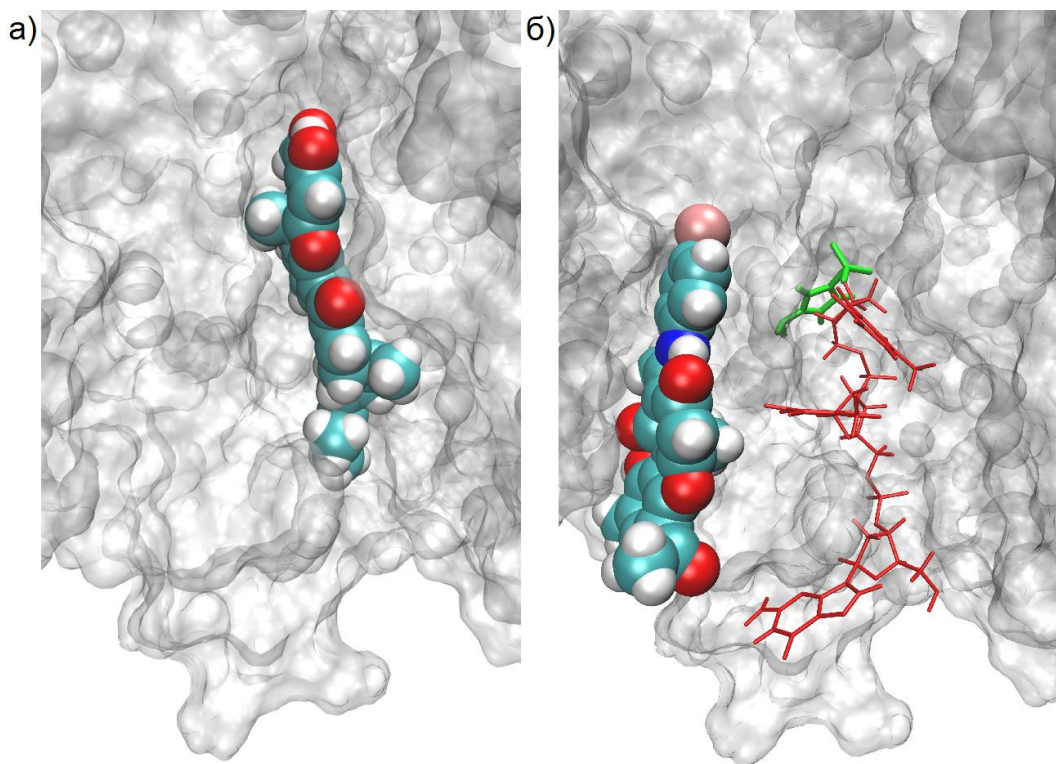


Рис. 7. Моделирование связывания производных усниновой кислоты с ТДФ1. (а) конкурентное связывание терпеноидного производного на участке связывания субстрата, (б) бесконкурентное ингибирование енамином усниновой кислоты. Красным цветом показан олигонуклеотид, ковалентно присоединенный к His263.

Детальный анализ строения активного центра в модели фермент-субстратного комплекса ТДФ1 выявил два обособленных участка, предназначенных для связывания фосфотирозиновой и олигонуклеотидной частей субстрата (рис. 8). На фосфотирозиновом участке связывается первая (с 3'-конца) фосфатная группа субстрата, вступая во взаимодействие с остатками Lys265, Asn283, Lys495, Asn516, а также со структурно упорядоченной молекулой воды. На участке связывания олигонуклеотида вторая фосфатная группа взаимодействует с остатками Ser400, Ser518 и двумя молекулами воды, а третья группа – с основными цепями остатков Ser403 и Ala520. Вышеперечисленные остатки могут служить мишенями для связывания сульфогруппы потенциальных ингибиторов ТДФ1.

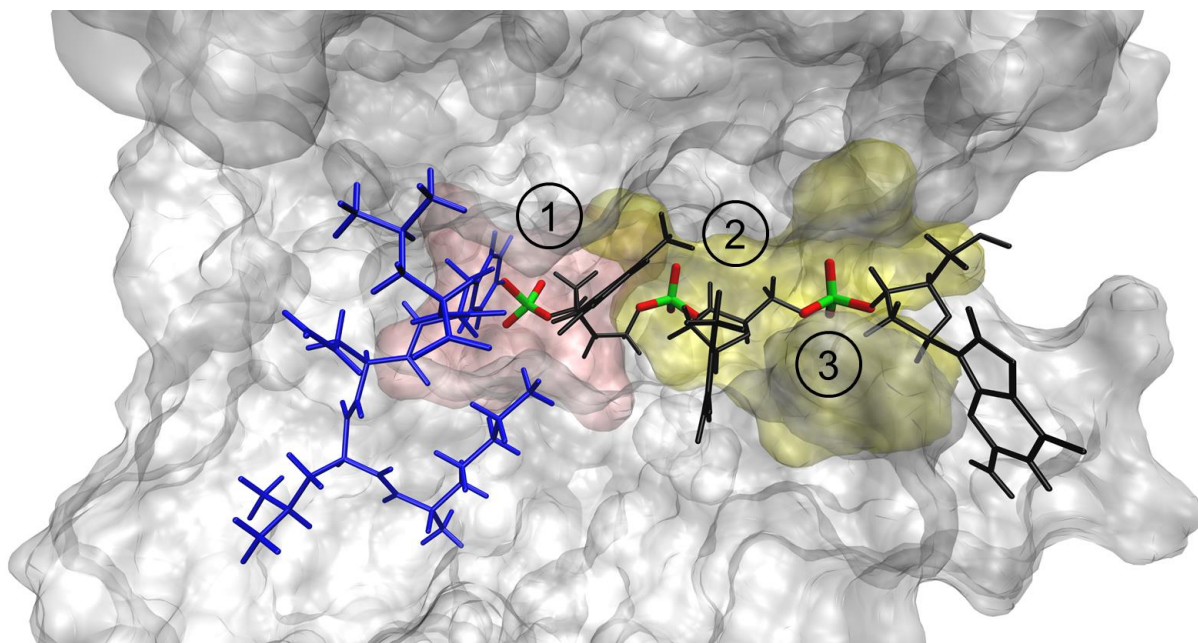


Рис. 8. Важные участки связывания субстрата и ингибиторов в активном центре ТДФ1. Участок связывания фосфотирозина обозначен розовым цветом, участок связывания олигонуклеотида – желтым. Синим цветом показана пептидная часть субстрата, серым – олигонуклеотидная часть. Фосфатные группы субстрата пронумерованы (группа 1 является частью остатка фосфотирозина).

Первичный скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

Из библиотеки Vitas-M были извлечены сульфонаты, удовлетворяющие «правилу трех» (всего 71 соединение). После докинга соединений в активный центр апоформы ТДФ1 осуществили структурную фильтрацию полученных позиций с помощью vsFilt. В качестве структурного критерия было выбрано взаимодействие сульфогруппы с сайтом связывания первой фосфатной группы субстрата (водородные связи с остатками Lys265, Asn283, Lys495, Asn516 и молекулой воды). Таким образом, сульфогруппа рассматривалась в качестве миметика 3'-фосфатной группы.

В результате для экспериментальной проверки отобрали два наиболее перспективных соединения, STK370528 и STK376552, в которых сульфогруппа соединена с гетероциклической группой с помощью тиоэфирного линкера (рис. 9, табл. 3). Исследование ингибиторной активности STK370528 и STK376552 было

осуществлено в ИХБФМ СО РАН с использованием рекомбинантной ТДФ1 человека, значение IC_{50} составило 83 и 686 мкМ соответственно.

Анализ модельных позиций показал, что метансульфонатный фрагмент оптимальным образом располагается на участке связывания фосфотирозина. В то же время, гетероциклическая часть ингибитора располагается на участке олигонуклеотида, и ее структура может быть оптимизирована для более эффективного связывания. Следует отметить, что докинг STK370528 и STK376552 в модель ковалентного интермедиата ТДФ1 не выявил позиций, в которых сульфозаместитель мог бы образовать эффективное взаимодействие посредством водородных связей. Это свидетельствует о предпочтительном связывании с апоформой ТДФ1 и конкурентном характере ингибирования.

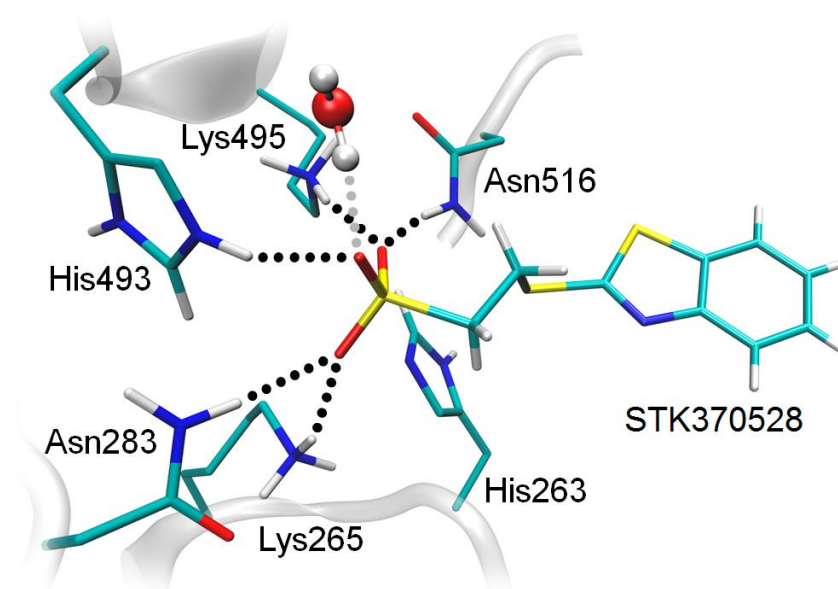
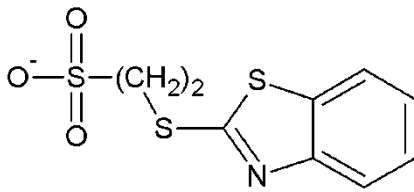
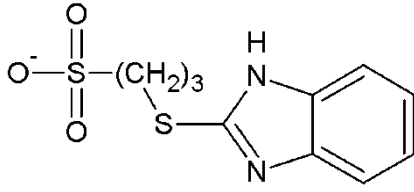


Рис. 9. Предсказанная позиция соединения STK370528 в активном центре ТДФ1. Пунктирными линиями показаны водородные связи на участке первой фосфатной группы субстрата.

Табл. 3. Сульфозамещенные соединения, обнаруженные в результате скрининга и проявившие ингибиторный эффект в отношении рекомбинантной ТДФ1 человека.

ID	Химическая структура	ΔG^{calc} , ккал/моль	IC ₅₀ , мкМ
STK370528		-8,7	83
STK376552		-8,0	686

Вторичный скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1

На следующем этапе оптимизировали гетероциклическую часть ингибитора, соединенную с сульфогруппой гибким линкером и располагающуюся на участке связывания олигонуклеотида (рис. 10). На основе базовой структуры STK370528 была сконструирована компьютерная библиотека производных путем автоматизированного перебора заместителей (всего 28519 соединений с учетом пространственной изомерии). При структурной фильтрации докированных позиций отбирали соединения, образующие дополнительные взаимодействия с сайтом связывания третьей фосфатной группы субстрата (водородные связи с остатками Ser403 и Ala520). В результате удалось идентифицировать несколько новых перспективных соединений (например, D854 на рис. 11 и 12).

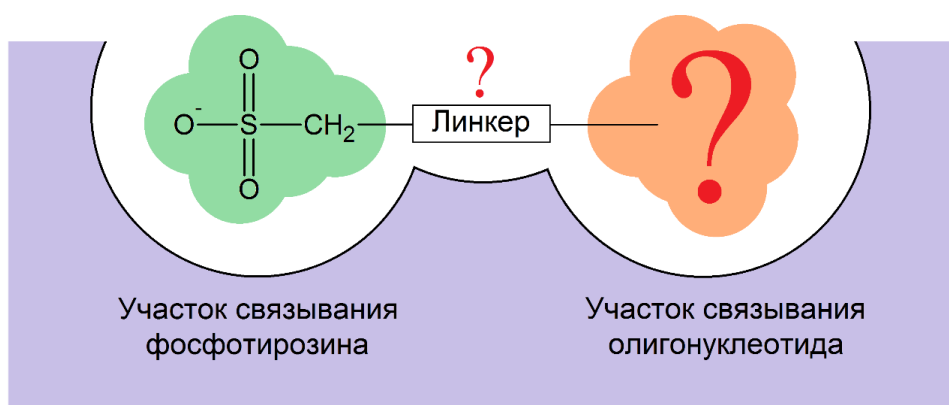


Рис. 10. Схематичное изображение связывания сульфозамещенного ингибитора в активном центре ТДФ1. Зеленым цветом показан метилсульфонатный фрагмент, оранжевым показана оптимизируемая гетероциклическая часть ингибитора.

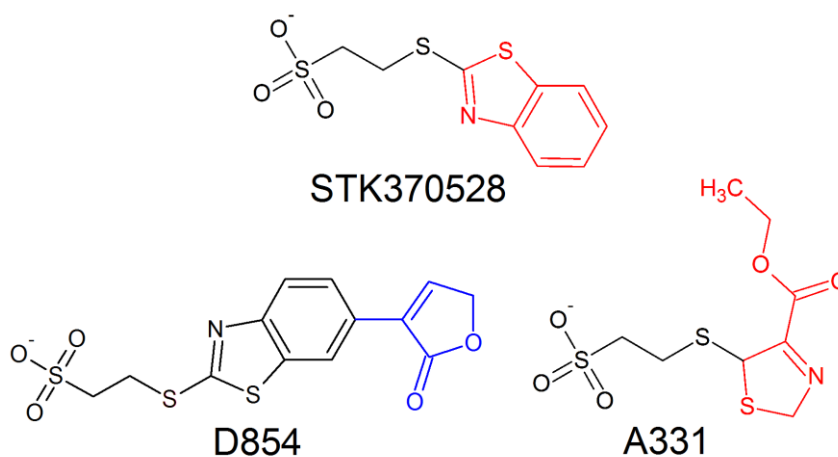


Рис. 11. Химические структуры ингибитора ТДФ1 STK370528, а также его перспективного производного D854 и аналога A331.

Бензотиазольный фрагмент STK370528 и его производных располагается в активном центре ТДФ1 таким образом, что ингибиторы не вступают в оптимальное взаимодействие с участком связывания второй фосфатной группы, характерное для субстрата. В связи с этим была исследована возможность замены бензотиазольной группы на более подходящий фрагмент. Было решено сконструировать библиотеку аналогов STK370528 и варьировать бензотиазольную часть и линкер, при этом значительно не отклоняясь от исходной структуры; всего было сгенерировано 956 соединений. При структурной фильтрации отбирали соединения, образующие дополнительные

взаимодействия с сайтом второй фосфатной группы субстрата (водородные связи с Ser400 и Ser518), среди которых удалось идентифицировать несколько новых потенциальных ингибиторов ТДФ1 (например, А331 на рис. 11 и 12).

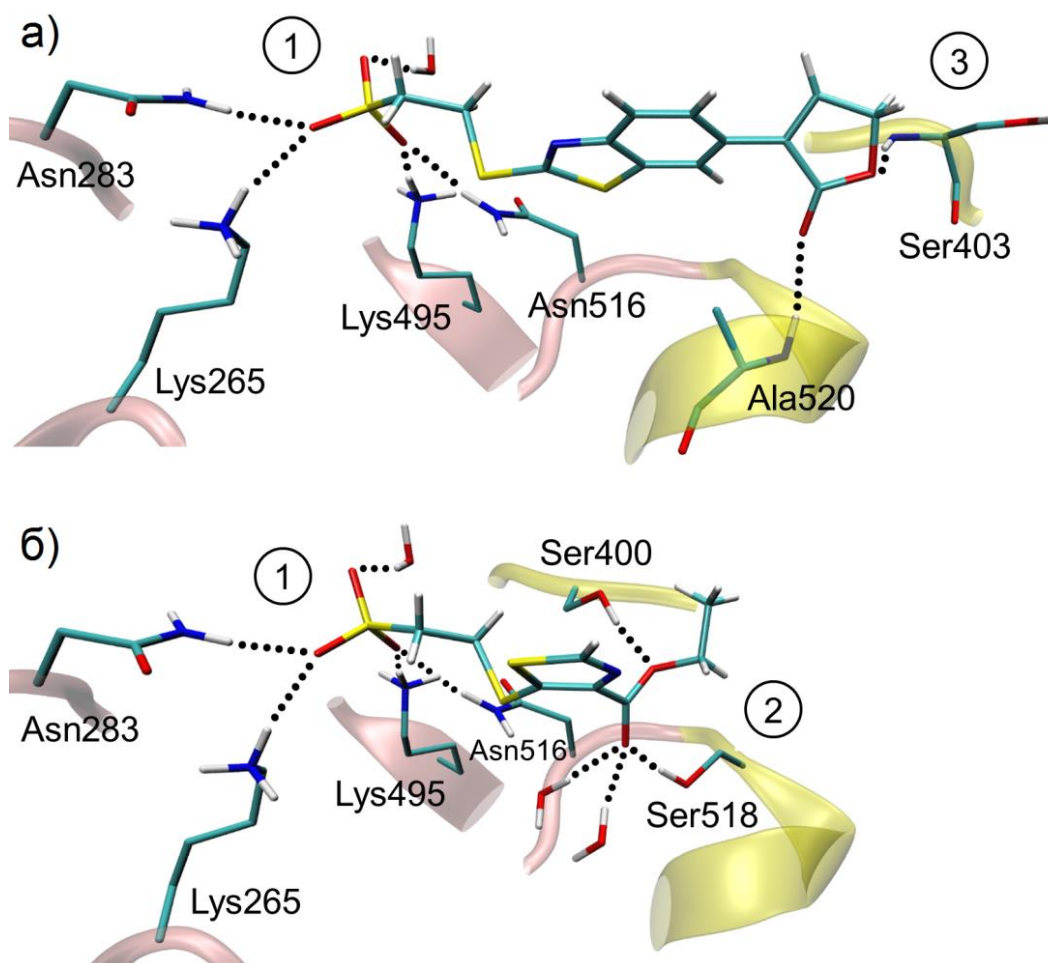


Рис. 12. Предсказанные позиции производных и аналогов STK370528 в активном центре ТДФ1: (а) соединение D854, (б) соединение А331. Участок связывания фосфотирозина обозначен розовым цветом, участок связывания олигонуклеотида – желтым. Сайты фосфатных групп субстрата пронумерованы.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. На основе кристаллических структур сконструированы молекулярные модели транскетолазы (ТК) *M. tuberculosis* и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (ТДФ1) человека, предназначенные для компьютерного поиска ингибиторов.
2. Путем биоинформатического анализа активного центра ферментов из разных организмов в ТК из *M. tuberculosis* идентифицирован кластер гидрофобных остатков Pe211-Leu402-Phe464, отсутствующий в ТК человека, что обуславливает возможность разработки селективных ингибиторов.
3. В результате анализа структуры активного центра ТДФ1 выявлены обособленные участки, важные для связывания субстрата и ингибиторов: участок фосфотирозина (содержащий остатки Lys265, Asn283, Lys495, Asn516) и участок олигонуклеотида (содержащий остатки Ser400, Ser403, Ser518, Ala520).
4. Разработаны критерии структурной фильтрации для отбора эффективных ингибиторов в процессе компьютерного скрининга с учетом специфических взаимодействий в активных центрах ТК и ТДФ1, создано необходимое программное обеспечение.
5. С помощью компьютерного скрининга выявлены соединения-ингибиторы ТК *M. tuberculosis*, содержащие сульфогруппу в качестве структурного миметика пирофосфатной группы кофермента и вариабельный гидрофобный фрагмент, обеспечивающий взаимодействие с кластером Pe211-Leu402-Phe464.
6. С помощью компьютерного скрининга обнаружены новые ингибиторы ТДФ1, содержащие сульфогруппу в качестве миметика фосфатной группы остатка фосфотирозина и гетероциклический фрагмент, обеспечивающий взаимодействие с участком олигонуклеотида.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ В ЖУРНАЛАХ SCOPUS, WOS, RSCI¹

1. **Gushchina I.**, Polenova A., Suplatov D., Švedas V., and Nilov D. vsFilt: A tool to improve virtual screening by structural filtration of docking poses. //Journal of Chemical Information and Modeling. – 2020. – V. 60. – P. 3692-3696; IF 4.549, квартиль Q1 (0,6/0,25).
2. **Гущина И.В.**, Нилов Д.К., Захаренко А.Л., Лаврик О.И., Швядас В.К. Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека. //Acta Naturae. – 2017. – V. 9. – P. 62-69; IF 2.0 (1,0/0,4).
3. Zakharenko A., Luzina O., Koval O., Nilov D., **Gushchina I.**, Dyrkheeva N., Švedas V., Salakhutdinov N., and Lavrik O. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors: usnic acid enamines enhance the cytotoxic effect of camptothecin. //Journal of Natural Products. – 2016. – V. 79. – P. 2961-2967; IF 3.281, квартиль Q1 (0,9/0,1).
4. Dyrkheeva N., Luzina O., Filimonov A., Zakharova O., Ilina E., Zakharenko A., Kuprushkin M., Nilov D., **Gushchina I.**, Švedas V., Salakhutdinov N., and Lavrik O. Inhibitory effect of new semisynthetic usnic acid derivatives on human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. //Planta Medica. – 2019. – V. 85. – P. 103-111; IF 2.687, квартиль Q1 (1,1/0,1).

ДРУГИЕ НАУЧНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нилов Д.К., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Балдин С.М., Швядас В.К. Применение фурансульфонатов для ингибирования транскетолазы патогена *Mycobacterium tuberculosis* //Патент на изобретение RU 2703465 C1. – 2019.
2. Швядас В.К., Суплатов Д.А., Нилов Д.К., Балдин С.М., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Шмальгаузен Е.В. Разработка методов дизайна селективных

¹ В скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах.

- ингибиторов ферментов на основе биоинформатического анализа суперсемейств и молекулярного моделирования. // *Материалы XXVI Симпозиума «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» в рамках XXVII Российского Национального Конгресса «Человек и Лекарство»*, Москва, Россия, 6-25 апреля 2020. – 2020.
3. **Gushchina I.V.**, Nilov D.K., and Švedas V.K. Rational design of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors as promising antitumor agents. // *Материалы 4-ой Российской конференции по медицинской химии (МедХим-2019) с международным участием*, Екатеринбург, Россия, 9-14 июня 2019. – 2019.
 4. Евтеев С.А., Поленова А.М., **Гущина И.В.**, Нилов Д.К., Швядас В.К. Рациональный дизайн сульфозамещённых противоопухолевых ингибиторов. // *Материалы IV Междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике МОБИ-ХимФарма2018*, Новый Свет, Крым, Россия, 23-26 сентября 2018. – 2018.
 5. Nilov D., **Gushchina I.**, Shcherbakova T., Meshalkina L., and Švedas V. First selective inhibitors of transketolase from *Mycobacterium tuberculosis* targeted towards both the pyrophosphate binding site and an adjacent hydrophobic site. // *Материалы конференции Chemical Biology 2018*, Хайдельберг, Германия, 29 августа - 1 сентября 2018. – 2018.
 6. **Gushchina I.**, Švedas V., and Nilov D. Selection of bifunctional tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors by molecular modeling. // *Материалы 43-го Конгресса FEBS*, Прага, Чехия, 7-12 июля 2018. – 2018.
 7. Швядас В.К., Суплатов Д.А., Нилов Д.К., Балдин С.М., **Гущина И.В.**, Щербакова Т.А., Шмальгаузен Е.В. Поиск селективных ингибиторов ферментов патогенов с использованием методов биоинформатики и молекулярного моделирования. // *Материалы Международного Форума "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (BIOTECH WORLD 2018)*, Москва, Россия, 23-25 мая 2018. – 2018.

8. Švedas V., **Gushchina I.**, Meshalkina L., Nilov D., Shmalhauzen E., and Suplatov D. How we do modulate functional properties of enzymes. // *Материалы конференции Biocatalysis-2017: Fundamentals & Applications*, Истра, Россия, 25-30 июля 2017. – 2017.
9. Nilov D.K., **Gushchina I.V.**, and Švedas V.K. Identifying new inhibitors of DNA repair enzymes. // *Материалы конференции Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications*, Истра, Россия, 25-30 июля 2017. – 2017.
10. Nilov D.K., **Gushchina I.V.**, and Švedas V.K. In silico screening for sulfonate-based inhibitors against promising anticancer targets. // *Материалы конференции Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016*, Новосибирск, Россия, 29 августа - 2 сентября 2016. – 2016.
11. **Gushchina I.V.**, Nilov D.K., Zakharenko A.L., Lavrik O.I., and Švedas V.K. Molecular model of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 for a structure-based screening for its inhibitors. // *Материалы конференции Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'15)*, Москва, Россия, 16-19 июля 2015. – 2015.