

**П.А. Карпов¹, О.М. Демчук¹, В.М. Брицун², Д.І. Литвин¹, М.О. Пидюра¹, О.В. Раєвський¹,
Д.О. Самофалова¹, С.І. Співак¹, Д.М. Волочнюк², А.І. Ємець¹, Я.Б. Блюм¹**

¹ Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України, Київ

² Інститут органічної хімії НАН України, Київ

НОВІ ІМІДАЗОЛЬНІ ПОХІДНІ ЯК ІНГІБІТОРИ FtsZ-БІЛКІВ МІКОБАКТЕРІЙ: ВІД ВИСОКОПРОПУСКНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО СКРИНІНГУ В Ґрід ДО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛІЗУ *in vitro*



У рамках реалізації головної мети створеної в УНГ віртуальної організації CSLabGrid було виконано пошук нових протитуберкульозних сполук. З використанням встановленої на IFBG Cluster програми FlexX і моделі чотирьох перспективних сайтів зв'язування лігандів на поверхні FtsZ-білка *Mycobacterium tuberculosis* було виконано скринінг бази даних, що містила 2886 сполук, синтезованих в Інституті органічної хімії НАН України. На підставі показників LE і ΔG , результатів докінгу в програмі CCDC Gold і обрахунку молекулярної динаміки комплексів було відібрано групу перспективних інгібіторів FtsZ. Під час експериментальної перевірки *in vitro* шість речовин проявили найвищу ефективність інгібування ГТФ-азної активності FtsZ-білка. Також за результатами експериментальної оцінки *in vitro* було обрано три речовини, які водночас проявляють максимальне пригнічення полімеризації та ГТФ-азної активності FtsZ-білка.

Ключові слова: туберкульоз, структурна біологія, біоінформатика, віртуальний скринінг, *in vitro*.

Туберкульоз є одним з найпоширеніших у світі інфекційних захворювань. Згідно з даними ВООЗ, у 2011 р. було зафіксовано 8,7 млн нових випадків цього захворювання, а також зареєстровано 1,4 млн летальних випадків, спричинених *Mycobacterium tuberculosis* [1, 2]. В Україні нова епідемія туберкульозу була зареєстрована у 1995 р. і, на жаль, ситуація досі залишається складною [3–6]. До цього слід зазначити, що лікування туберкульозу ускладнюється внаслідок багатьох факторів, серед яких чи не найголовнішим є генетично обумовлена варіабельність цільових білків *M. tuberculosis*, які є мішенями для лікарських засобів [7]. З цієї точки зору найбільш доцільною є стратегія по-

шуку нових лікарських сполук, мішенями для яких були б найбільш консервативні цільові білки. Відомо, що більшість існуючих протитуберкульозних препаратів діють на стадії синтезу компонентів клітинної стінки [8–10]. Серед сполук з антитуберкульозною активністю також відомі такі похідні бензімідазолу, як VRT-125853 та VRT-752586 [11, 12], котрі діють шляхом пригнічення бактеріальних топоізомераз II і IV [11, 13].

Водночас зі зростанням кількості штамів *M. tuberculosis*, резистентних до існуючих ліків, пошук нових молекулярних мішеней і сполук є запорукою успіху у боротьбі з епідемією туберкульозу [14]. Без сумніву, найбільший потенціал можуть проявляти білки, які складають апарат поділу клітини [15]. В першу чергу цій вимозі відповідають бактеріальні гомологи тубуліну, а саме FtsZ-білки (Filamental tem-

© П.А. КАРПОВ, О.М. ДЕМЧУК, В.М. БРИЦУН,
Д.І. ЛИТВИН, М.О. ПИДЮРА, О.В. РАЄВСЬКИЙ,
Д.О. САМОФАЛОВА, С.І. СПІВАК, Д.М. ВОЛОЧНЮК,
А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ, 2016

perature-sensitive protein Z) [12, 16, 17]. Глобулярні частини FtsZ-білків і тубулінів еукаріотів демонструють досить високу подібність просторової структури [2]. Разом вони утворюють спільну родину білків, яка значно відрізняється від інших ГТФ-зв'язуючих білків [17]. Враховуючи наявність певної подібності структур FtsZ-білків і тубулінів селективність взаємодії лігандів з FtsZ-білком мікобактерії має бути обумовлена певними відмінностями амінокислотного складу у відповідних сайтах цього білка у порівнянні з тубуліном людини. Згідно з даними літератури і результатами власних досліджень ми розглядаємо похідні імідазольного ряду як дуже перспективні кандидати на роль інгібіторів полімеризації FtsZ-білків [2, 13, 18]. *По-перше*, різні імідазольні похідні демонструють певну специфічність до різних β -тубулінів на рівні представників окремих царств [19, 20]. *По-друге*, на прикладі похідних бензімідазолу була доведена здатність викликати порушення цитоскелету бактерій [21–23].

Основними вимогами до методичних підходів, що застосовуються при дослідженні речовин, здатних впливати на полімеризацію FtsZ-білків, є їх висока чутливість до хімічних агентів та можливість максимального відтворення *in vitro* біохімічної реакції полімеризації, що відбувається в живій клітині. На початку поділу прокариотичної клітини FtsZ-білки утворюють цитокінетичне кільце в центральній частині клітини, яке виконує функцію каркасу для збирання інших білків клітинного поділу. Формування так званого *Z-кільця* має вирішальне значення для правильної локалізації площини поділу бактерії. Динамічне збирання FtsZ-кільця регулюється чисельною групою білків залежно від виду бактерій [24]. Наприклад, білки ZapA, ZipA і FtsA є стабілізуючими факторами, в той час як білки SulA, EzrA і MinCD є характерними дестабілізуючими чинниками [25]. Надекспресія стабілізуючих факторів призводить до формування ненормально розширеної структури FtsZ-кільця, натомість надекспресія дестабілізуючих факторів може мати наслідком руйнування FtsZ-полі-

мерних утворень [26]. Білок SepF сприяє збірці FtsZ-білка у критичній концентрації та утворює стабільні комплекси з його мономерами. Серед негативних регуляторів формування *Z-кільця* *M. tuberculosis* слід назвати білки SulA, EzrA та MinCD⁴. Так, білок SulA безпосередньо зв'язується з FtsZ-білком і, залежно від концентрації, може інгібувати або полімеризацію, або ГТФ-азну активність останнього. Білок EzrA здатний дестабілізувати щойно утворене FtsZ-кільце, перешкоджаючи таким чином утворенню *Z-кільця* у неспецифічних локусах клітини. Нарешті, білки MinCD⁴ перешкоджають утворенню аномальних *Z-кільць* на полюсах клітини [27].

Особливості полімеризації FtsZ-білків інтенсивно досліджуються в умовах *in vitro*, тому формування ними початкових надмолекулярних утворень, таких, як прямі та вигнуті протофіламенти, листки філаментів, а також пучки та трубки філаментів добре описані в залежності від складових компонентів буферу полімеризації, концентрації нуклеотидів, а також додаткових білків, що брали участь у реакції. Архітектура протофіламентів FtsZ в природних умовах ще остаточно не з'ясована, хоча експерименти з використанням електронної криотомографії на клітинах *Caulobacter crescentus* дозволяють припустити, що *Z-кільце* утворюється не в результаті обширної збірки, а внаслідок поєднання відносно коротких, первинних протофіламентів [28].

Таким чином, не викликає жодного сумніву, що бактеріальні FtsZ-білки входять до переліку молекулярних мішеней першочергової фармакологічної важливості і заслуговують на найпильнішу увагу. На підтвердження цього можна навести нещодавно отримані результати досліджень *I. Ожима* та співавторів [2], де на прикладі трьохзаміщених похідних бензімідазолу була експериментально доведена їх здатність ефективно інгібувати FtsZ-білок мікобактерії. Саме ця робота з урахуванням наших напрацювань у галузі структурної біоінформатики та експериментальних досліджень FtsZ-білків, синтезу нових сполук імідазольної групи [13, 23] та роз-

робок алгоритмів застосування Ґрид-технологій для пошуку та відбору нових речовин з активністю проти тубуліну [29–32] наптовхнула нас на ідею постановки експерименту із залученням високопропускного молекулярного скринінгу для відбору сполук імідазольного ряду, здатних ефективно інгібувати полімеризацію FtsZ-білків. Зокрема, авторами цієї статті з Інституту органічної хімії (ІОХ) НАН України була створена хімічна бібліотека похідних імідазолу, яка зараз налічує 2886 індивідуальних сполук. Саме ця бібліотека і була використана нами як підґрунтя для створення бібліотеки лігандів для віртуального скринінгу із залученням обчислень у Ґрид.

У 2011 р. на основі Ґрид-вузла Інституту харчової біотехнології і геноміки (ІХБГ) НАН України (<http://ifbg.org.ua>) була створена віртуальна організація (ВО)/лабораторія CSLabGrid (<http://ifbg.org.ua/uk/cslabgrid>; www.youtube.com/user/CSLabGrid) [29–32]. Головною метою ВО CSLabGrid було визначено об'єднання обчислювальних ресурсів і фахівців для вирішення наукових та прикладних задач у галузі молекулярно- та клітинно-біологічних досліджень цитоскелету. Тому саме реалізація проекту з відбору інгібіторів FtsZ *M. tuberculosis* стала прикладом скринінгу біологічно-активних сполук, який повністю відповідає концепції розвитку ВО CSLabGrid, а саме практичному поєднанню обчислень у Ґрид з наступним лабораторним підтвердженням, тобто кінцевою метою цієї роботи було відтворення алгоритму сучасного драг-дизайну «хімічний синтез → віртуальний скринінг → лабораторне підтвердження біологічної активності» на прикладі сполук безімідазольного ряду, здатних інгібувати полімеризацію FtsZ-білків.

МЕТОДИЧНІ ОСНОВИ РОЗРОБКИ

Моделювання тривимірної моделі FtsZ-білка *M. tuberculosis*

Повна амінокислотна послідовність FtsZ-білка (P64170) [33, 34] *M. tuberculosis* була отримана з бази даних UniProtKB (www.uniprot.org)

[35]. За результатами PDB-blast пошуку було відібрано найближчі кристалографічні структури FtsZ-білка з *M. tuberculosis*, депоновані в RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org): 2Q1X (2,35 Å), 2Q1Y (2,30 Å), 1RLU (2,08 Å), 1RQ2 (1,86 Å) і 1RQ7 (2,6 Å). Якість PDB-структур аналізували за допомогою програмного пакету «DeepView-Swiss-PDBViewer 4.0.3» (www.expasy.org/spdbv) [36].

Моделювання структури білка за гомологією було виконано за допомогою пакету Modeller 9v8 (<http://salilab.org/modeller>) [37] з використанням відібраних шаблонних структур з RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Було застосовано два профільні методи: 1) з використанням однієї матричної x-Ray структури (Modeller) і 2) з використанням ряду матриць згідно з алгоритмом сервера I-TASSER [38, 39]. Методом профільного моделювання була побудована 3D-модель фрагмента цього білка від амінокислотного залишку Asn6 по Asp313 включно.

Також із використанням інструменту I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) було побудовано 5 повноатомних моделей (job id S119158): Model 1 (C-score=-0.85); Model 2 (C-score=-1.68); Model 3 (C-score=-2.11); Model 4 (C-score=-2.43) і Model 5 (C-score=-3.04) (рис. 1). Згідно з протоколом сервера моделювання в I-TASSER здійснювалося на підставі 10-и структур лідерів (табл. 1): 2rhl_A (2,45 Å) із *Bacillus subtilis*; 4dxd_A (2,01 Å) із *Staphylococcus aureus*; 1fsz_A (2,8 Å) із *Methanocaldococcus jannaschii*; 2vam_A (2,50 Å) із *Bacillus subtilis*; 2rhl_B (2,45 Å) із *Bacillus subtilis*; 4dxd_B (2,01 Å) *Staphylococcus aureus*; 1w5f_A (2,0 Å) із *Thermotoga maritima*; 2rhl_B (2,45 Å) із *Bacillus subtilis*; 1rlu_A (2,08 Å) із *Mycobacterium tuberculosis* і 2vaw_A (2,9 Å) *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 1).

Остаточна повноатомна модель FtsZ-білка з *M. tuberculosis* була побудована на підставі профільного моделювання з використанням даних PDB та результатів, отриманих за допомогою інструменту I-TASSER. Збирання моделі виконувалося за допомогою інструменту EasyModeller 4.0 [40]. Молекулярну динаміку моделі оцінюва-

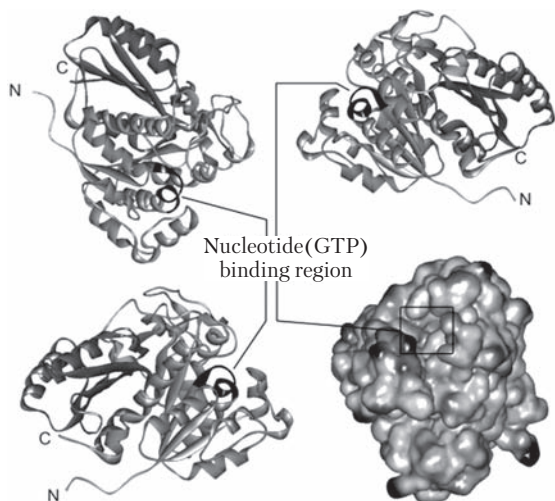


Рис. 1. Повноатомна модель FtsZ-білка *M. tuberculosis* була побудована методом моделювання за гомологією з використанням x-Ray структур FtsZ-білка з *M. tuberculosis* (2Q1X (2.35 Å), 2Q1Y (2.30 Å), 1RLU (2.08 Å), 1RQ2 (1.86 Å) і 1RQ7 (2.60 Å), а також за результатами моделювання з використанням серверу I-TASSER

ли у водному оточенні з використанням пакету Gromacs (IFBG Cluster). Після сольватації і 10 нс релаксації з використанням силового поля amber99 (GROMACS v. 4.5.5) якість геометрії моделі була підтверджена за допомогою сервера ANOLEA (Atomic Non-Local Environment Assessment) (www.protein.bio.puc.cl) [41], програми ProCheck [42] та сервера MolProbity [43]. Заключну перевірку результатів виконували за допомогою Verify3D [44]. Остаточна візуалізація структур, структурне вирівнювання моделей, а також аналіз відповідних амінокислотних залишків здійснювали з використанням програмних пакетів Accelrys Discovery Studio Visualizer 3.1 (Accelrys Software Inc.-<http://accelrys.com>) і PyMOL (<http://www.pymol.org/>) (рис. 2).

Бібліотеки низькомолекулярних сполук

Бібліотека лігандів для молекулярного скринінгу і докінгу була створена на базі колекції сполук імідазольного ряду, синтезованих в ІОХ НАН України, загалом 2886 індивідуальних сполук в форматах *.sd/*mol, *.mol2. Як контроль було використано трьохзамісні похідні бензі-

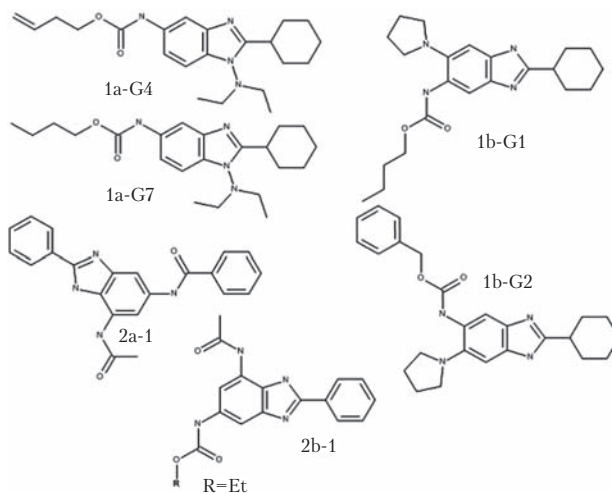


Рис. 2. Структури трьохзамісних бензімідазолів, синтезованих «Ojima Research Group», які використовувалися для дослідження потенційної спорідненості бензімідазолів до чотирьох досліджених сайтів: 1a-G4 (5-But-3-enoxy carbonylamino-2-cyclohexyl-6-N,N-diethylamino-1H-benzo[d]imidazole), 1a-G7 (5-butoxycarbonylamino-2-cyclohexyl-6-N,N-diethylamino-1H-benzimidazole), 1b-G1 (5-Butoxycarbonylamino-2-cyclohexyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1H-benzo[d]imidazole), 1b-G2 (5-Benzyloxy carbonylamino-2-cyclohexyl-6-(pyrrolidin-1-yl)-1H-benzo[d]imidazole), 2a-1 (7-Acetylamino-5-ethoxycarbonylamino-2-phenyl-1H-benzo[d]imidazole) і 2b-1 (ethyl-N-(5-acetamido-1-hydrogenio-2-phenyl-3a,6-dihydro-1H-1,3-benzodiazol-6-yl)-N-hydrogeniocarbamate) [2]

мідазолу, синтезовані групою проф. Ожима [2] (рис. 3, див. кольорову вклейку). З урахуванням конформамерів, побудованих за допомогою програми JChem 5.12.0 (ChemAxon, 2012 — www.chemaxon.com), остаточна кількість лігандів склала >5000. Файли топології були отримані за допомогою сервера SwissParam (www.swissparam.ch) [45].

Пошук можливих сайтів зв'язування гетероциклічних сполук на поверхні молекули FtsZ-білка *M. tuberculosis*

Оскільки зараз не існує кристалографічно введених комплексів гетероциклічних сполук імідазольної групи з FtsZ-білками, нами було здійснено пошук найбільш імовірних сайтів зв'язування даних сполук на поверхні молекули цільового білка за допомогою сервера I-TASSER

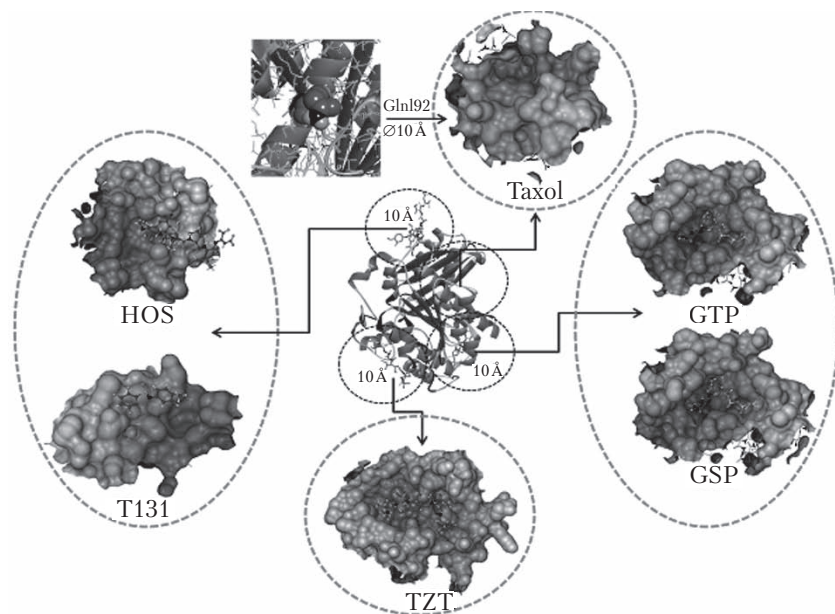
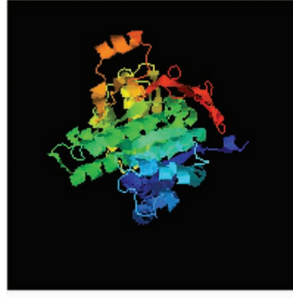


Рис. 4. Моделювання перспективних сайтів зв'язування імідазолів. Використовуючи метод референсних лігандів з відстанню 10 Å, в програмі LeadIT було побудовано моделі 4-х найбільш перспективних сайтів: 1) GTP/GSP, 2) TZX-1027, 3) HOS/T13 і 4) Taxol

(модуль «Predicted Binding Site») та побудовано теоретичні комплекси з лігандами матричних структур: GSP (1rlu_A), SO4 (2rhh_A і 2rhj_A), PEPTIDE (1rq2), MG (3e22_C і 1z2b_C), T13 (3hke_B), HOS (3du7_C) і TZX (3e22_C) (рис. 1).

Моделювання було виконано для сайтів зв'язування: GSP (5'-гуанозин-дифосфат-монотіофосфат), T13 (2,3,4,5,6-пентафтор-N-(3-фтор-4-метоксифеніл) бензенсульфон амід), HOS (фомопсин А) і TZX-1027 (соблідотин). Крім того, за результатами структурного вирівнювання FtsZ-білка і тубуліну була побудована модель потенційного сайту зв'язування таксолу. Як референсні комплекси використовували PDB структури 2WBE, 3DCO, 2P4N, 2NHX і 1JFF. Таким чином, за допомогою програми LeadIT з використанням методу референсних лігандів було побудовано моделі чотирьох сайтів зв'язування: GTP/GSP; TZX-1027; HOS/T13 і Taxol (рис. 4). Побудовані моделі були потрібні для виконання молекулярного докінгу. Також вони були додані до репозиторію віртуальної організації (ВО) CSLabGrid з метою їх подальшого використання у дослідженнях, що проводяться в рамках діяльності ВО CSLabGrid.

Наступна оцінка сайтів зв'язування була виконана за допомогою локальної версії пакету LeadIT v.2.1.3 і результатів докінгу низькомолекулярних лігандів з використанням пакету CCDC GOLD. При використанні модуля Hyde (LeadIT) на підставі показників енергії зв'язування (ΔG) і Ligand Efficiency (LE) контрольних бензімідазолів 1a-G4 (5-бут-3-єноксикарбоніламіно-2-циклогексил-6-N,N-диметиламіно-1H-бензо[д]імідазол, 1a-G7 (5-бутоксикарбоніламіно-2-циклогексил-6-N,N-диметиламіно-1H-бензо[д]імідазол, 1b-G1 (5-бутоксикарбоніламіно-2-циклогексил-6-(піролідин-1-іл)-1H-бензо[д]імідазол, 1b-G2 (5-бензілоксикарбоніламіно-2-циклогексил-6-(піролідин-1-іл)-1H-бензо[д]імідазол, 2a-1 (7-ацетиламіно-5-етоксикарбоніламіно-2-феніл-1H-бензо[д]імідазол) і 2b-1 (етил-п-(5-ацетамідо-1-гідроген-2-феніл-3a,6-дигідро-1H-1,3-бензімідазол-6-іл)-n-гідрогеніокарбамат) (рис. 3 і 5) була встановлена можливість зв'язування трьохзамісних бензімідазолів у чотирьох вищезазначених сайтах. Результати наступної перевірки на підставі аналізу їх молекулярного докінгу за допомогою пакету CCDC GOLD свідчать про те, що за показниками GoldScore, ChemScore і ASP сайт зв'язу-



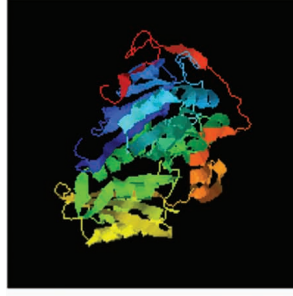
[Download Model 1](#)

C-score=-0.85



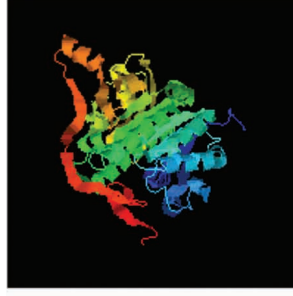
[Download Model 2](#)

C-score=-1.68



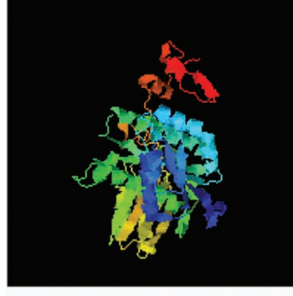
[Download Model 3](#)

C-score=-2.11



[Download Model 4](#)

C-score=-2.43



[Download Model 5](#)

C-score=-3.04

Estimated accuracy of Model1: 0.61 ± 0.14 (TM-score) $8.6 \pm 4.5 \text{ \AA}$ (RMSD) ([Read more about C-score of generated models](#))

Top 10 Identified structural analogs in PDB

Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^b	Cov.	Download
1	1w681I	0.822	0.80	0.439	0.871	Download
2	2z7z5I	0.795	2.10	0.438	0.850	Download
3	2dl1A	0.793	1.41	0.640	0.821	Download
4	2c3wA	0.781	1.77	0.516	0.818	Download
5	1dl1A	0.770	1.56	1.000	0.805	Download
6	2hd5A	0.722	3.59	0.121	0.880	Download
7	3ou7D	0.708	3.80	0.126	0.844	Download
8	3c5zA	0.707	3.71	0.111	0.847	Download
9	1ll1A	0.707	3.65	0.103	0.847	Download
10	458dA	0.694	3.13	0.597	0.805	Download

(a) Query structure is shown in cartoon, while the structural analog is displayed using backbone trace.

(b) Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library.

(c) RMSD^a is the RMSD between residues

(d) IDEN^b is the percentage sequence id

(e) Cov. represents the coverage of the

Найближчі шаблонні структури

Передбачені комплекси з лігандами

Template proteins with similar binding site:

Rank	Cyscore ^a	PDB Hit	TM-score	RMSD ^b	IDEN ^c	Cov.	BS-score ^d	Lig. Items	Download Predicted binding site residues in the model
1	0.84	1ll1A	0.770	1.56	1.000	0.805	1.96	GSP	Download 17,18,19,22,27,68,69,70,101,102,104,105,106,107,132,136,140,180,183,184,187
2	0.72	2hd5A	0.778	1.29	0.655	0.802	1.70	SC4	Download 17,18,194,105,106,107
3	0.69	2hd5A	0.793	1.41	0.640	0.821	1.96	SC4	Download 42,68,69,70,105,106
4	0.48	1d2D	0.790	1.48	1.000	0.792	1.98	PEPTIDE	Download 10,47,48,56,56,57,58,59,60,61,66,68,69,91,92,93,94,121,122,123
5	0.21	3d22C	0.693	3.61	0.104	0.834	1.34	MG	Download 67,70,105,106
6	0.15	1d26C	0.694	3.74	0.099	0.842	0.86	MG	Download 68,71,105
7	0.03	3hd5B	0.703	3.69	0.131	0.834	0.96	T13	Download 187,201,203,204,260,261
8	0.03	3ou7D	0.695	3.69	0.107	0.842	0.99	HCS	Download 269,272,273,290,292
9	0.03	3d22C	0.693	3.61	0.104	0.834	0.83	TZT	Download 112,115,116

Click on the radio buttons to visualize predicted binding site.

(a) Cyscore^a is the confidence score of predicted binding site. Cyscore^a values range in between [0-1], where a higher score indicates a more reliable ligand-binding site prediction.

(b) RMSD^b is a measure of local similarity (sequence & structure) between template binding site and predicted binding site in the query structure. Based on large scale benchmarking analysis, we have observed that a BS-score > 1 reflects a significant local match between the predicted and template binding site.

(c) TM-score is a measure of global structural similarity between query and template protein.

(d) RMSD^c the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.

(e) IDEN^d is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.

(f) Cov. represents the coverage of global structural alignment and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

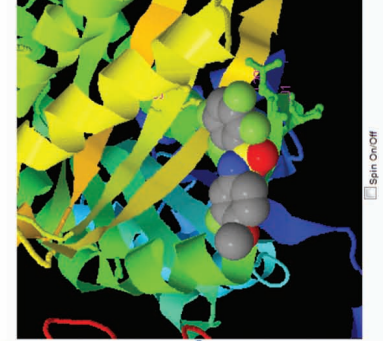


Рис. 3. Моделювання просторової структури FtsZ з *M. tuberculosis* і реконструкція ліганд-білкових комплексів («Predicted Binding Sites» за допомогою I-TASSER (Job ID: S119158))

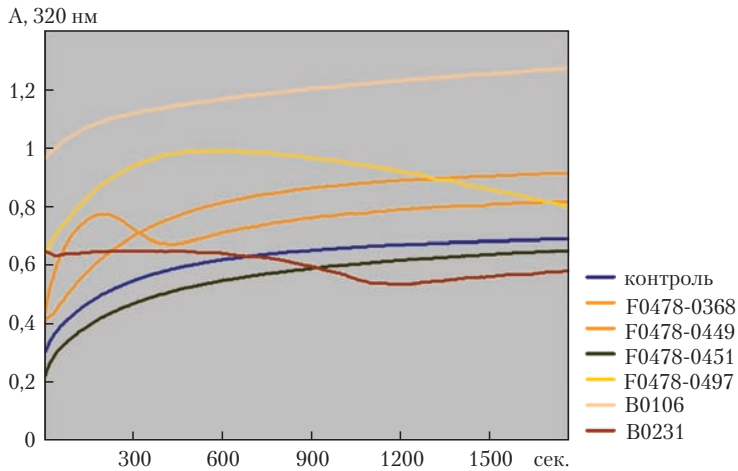


Рис. 6. Динаміка полімеризації FtsZ в присутності речовин, що не мали інгібіторного впливу: F0478-0368, F0478-0449, F0478-0451, F0478-0497, B0106, B0231

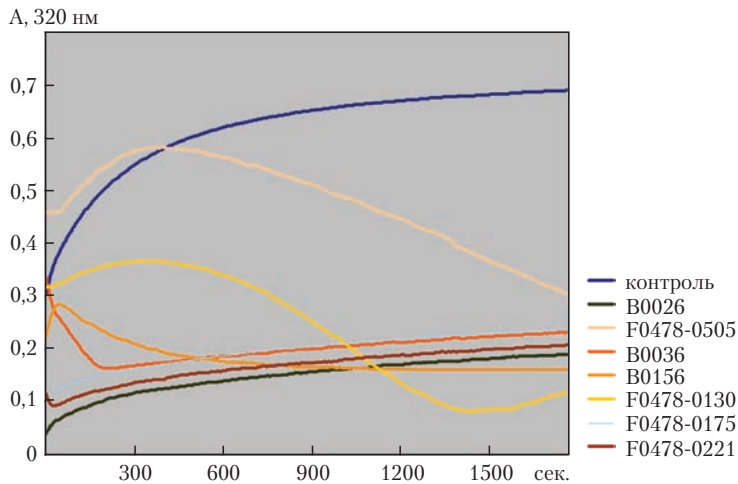
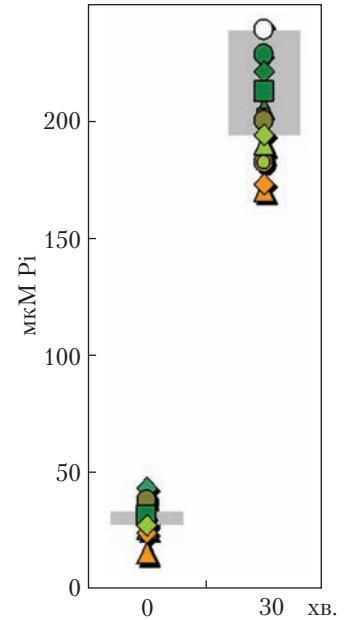


Рис. 7. Динаміка полімеризації FtsZ в присутності речовин з виразним інгібіторним ефектом: B0026, F0478-0505, B0036, B0156, F0478-0130, F0478-0175, F0478-0221



- контроль
- ▲ B0036
- △ B0026
- ◆ B0106
- F0478-0368
- B0156
- ◇ F0478-0449
- B0231
- ▲ F0478-0451
- F0478-0130
- F0478-0497
- ◇ F0478-0175
- F0478-0505
- ◇ F0478-0221

Рис. 8. Інгибування ГТФ-азної активності FtsZ досліджуваними сполуками

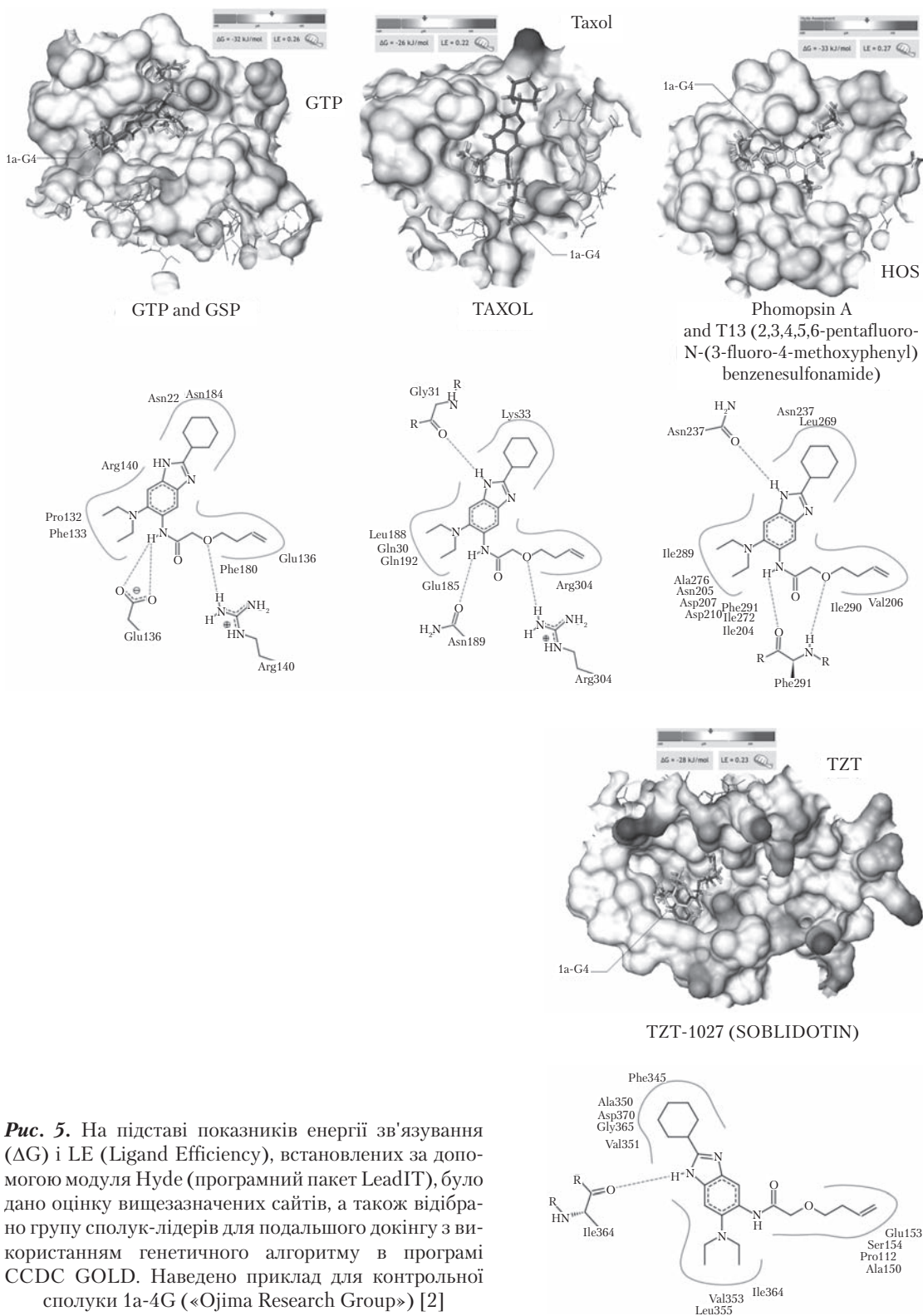


Рис. 5. На підставі показників енергії зв'язування (ΔG) і LE (Ligand Efficiency), встановлених за допомогою модуля Hude (програмний пакет LeadIT), було дано оцінку вищезазначених сайтів, а також відібрано групу сполук-лідерів для подальшого докінгу з використанням генетичного алгоритму в програмі CCDC GOLD. Наведено приклад для контрольної сполуки 1a-4G («Ojima Research Group») [2]

вання GTP/GSP є пріоритетним для контрольних сполук [46, 47]. Останнє також було підтверджено результатами молекулярної динаміки комплексів в Gromacs (charmm27). Таким чином, подальший віртуальний скринінг тестованих сполук виконували саме з використанням ГТФ-зв'язуючого сайту.

Віртуальний скринінг в Грід за алгоритмом FlexX та подальша перевірка сполук лідерів за допомогою CCDC Gold і молекулярної динаміки

Високопропускний віртуальний скринінг похідних бензімідазолу виконували за допомогою методу молекулярного докінгу з використанням програми FlexX, яку було встановлено на обчислювальному кластері ДУ ІХБГ НАН України (IFBG Cluster) [32, 48]. Було використано 2 персональні академічні ліцензії терміном на 1 місяць кожна: SN: 0BS080F1E97114A3B62E417780A8752D6F3; SN: 0BS61DE9C1DFA4CD32BABB9DC02452EFF0B. Безпосередньо обчислення виконували за допомогою сервера HP ProLiant AV340A (8 обчислювальних ядер) (BO CSLabGrid). Як мішень використовували раніше побудовану модель ГТФ-зв'язуючого сайту FtsZ-білка з *M. tuberculosis* і бібліотеку сполук, синтезованих в ІОХ НАН України.

Оцінка комплексів гетероциклічних сполук імідазольної групи з FtsZ-білком була виконана на підставі оціночних функцій пакету LeadIT: «Score», «Match», «Lipo», «Ambig», «Clash», «Rot», «RMSD», «Simil», «Match», а також функцій оцінки спорідненості ліганду: ΔG (Gibbs free energy/Binding affinity) і LE (Ligand efficiency) модуля Hyde (<http://www.biosolveit.de>) [49, 50]. За результатами комплексної перевірки було відібрано 50 перспективних сполук.

Наступним етапом було проведено докінг 50-и обраних сполук в ГТФ-зв'язуючий сайт FtsZ-білка *M. tuberculosis* з використанням пакету CCDC GOLD 5.2.2 (www.ccdc.cam.ac.uk) [46, 47]. Для контролю докінгу також було використано трьохзамісні бензімідазоли, синтезовані групою проф. Ожима [2]: 1a-G4, 1a-G7,

1b-G1, 1b-G2, 2a-1 і 2b-1. Залучення генетичного алгоритму Gold дало можливість здійснити остаточний відбір найбільш перспективних сполук на підставі розрахунку показників енергії зв'язування та наявності і кількості водневих зв'язків. За оціночними функціями GoldScore, ChemScore і ASP кількість речовин у виборці була зменшена до 26-и сполук.

На останньому етапі оцінки була застосована молекулярна динаміка ліганд-білкових комплексів з використанням програмного пакету GROMACS (v. 4.5.5) [51, 52] і силового поля charmm27 (www.charmm.org) [53]. Дані по топології лігандів для силового поля charmm27 було отримано з бази даних SwissParam [45]. Обрахунки виконували у водному оточенні (модулі «editconf» та «genbox»). Об'єм водного оточення генерувався автоматично. Дальні електростатичні взаємодії враховували за допомогою методу PME (Particle Mesh Ewald) [54]. Негативний заряд отриманих молекулярних систем нейтралізували за допомогою модуля «genion» шляхом заміщення молекул води іонами натрію та хлору до відповідного рівня фізіологічної концентрації (0,15 моль/л). Попередню оптимізацію геометрії молекулярних систем виконували шляхом мінімізації потенційної енергії («grompp» та «mdrun») з використанням алгоритмів крутого спуску (steepest descent) при максимальній кількості кроків 1000 і градієнті 0,1. Мінімізацію енергії також здійснювали з використанням силового поля charmm27 [53]. Наступну процедуру обмеженої молекулярної динаміки (молекулярного рестрейнінгу) також проводили з використанням вищезазначених модулів при температурі 310 К протягом 0,2 пс. Процес молекулярної динаміки тривалістю 50 нс також здійснювали за допомогою модулів «grompp» та «mdrun».

Для імітації об'єму розчинника було застосовано періодичні граничні умови. Температура системи підтримувалась на рівні 310 К за допомогою термостата Берендсена з часом взаємодії 0,1 пс. Постійний тиск підтримувався за допомогою функції зовнішнього баростата.

Довжина зв'язків за участі атомів водню була зафіксована на рівноважному рівні за допомогою алгоритму Lincs [55]. Аналіз результатів молекулярної динаміки комплексів ліганд—FtsZ-білок здійснювали з використанням модуля «g-energy», який дозволяє здійснювати оцінку кулонівських та леннард—джонсівських (LJ) взаємодій ліганду як у складі комплексу з білком, так і у вільному стані у водному оточенні.

Енергію зв'язування ліганду з білком обраховували за формулою [56]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha(\langle V_{\text{L-sLJ}} \rangle_{\text{p}} - \langle V_{\text{L-sLJ}} \rangle_{\text{w}}) + \beta(\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{p}} - \langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{w}}), \quad (1)$$

де $\langle V_{\text{L-sLJ}} \rangle_{\text{p}}$ — LJ-складова взаємодії ліганд/білок; $\langle V_{\text{L-sLJ}} \rangle_{\text{w}}$ — LJ-складова взаємодії ліганд/вода; $\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{p}}$ — електростатична складова взаємодії ліганд/білок; $\langle V_{\text{L-s el}} \rangle_{\text{w}}$ — електростатична складова взаємодії ліганд/вода.

Значення коефіцієнтів були стандартними [57] та дорівнювали $\alpha = 0,18$ і $\beta = 0,50$.

За результатами обрахунку молекулярної динаміки досліджуваних комплексів було зроблено висновок, що найбільшою спорідненістю до FtsZ-білка мікобактерії характеризуються шість речовин: F0478-0451, F0478-0505, F0478-0368, B0026, F0478-0175 та F0478-0221.

Експериментальна перевірка сполук-лідерів *in vitro*

Для експериментальної перевірки з ІОХ НАН України було передано зразки шести сполук-лідерів, а також зразки семи сполук, які за результатами скринінгу не проявили відповідної спорідненості до FtsZ-білка. Подальшу експериментальну перевірку впливу досліджуваних сполук на полімеризацію FtsZ-білка проводили за допомогою двох методів: 1) спектрофотометричного визначення динаміки полімеризації FtsZ-білка при 320 нм та 2) колориметричного визначення гідролізу ГТФ в реакції з малахітовим зеленим. У роботі було використано препарат FtsZ-білка виробництва Cytoskeleton Inc. Ліофільний препарат білка

ресуспендували у буфері (100 мМ MES-NaOH, $pH = 6,5$, 1 мМ EGTA, 10 мМ CaCl_2) до концентрації 1 мг/мл, після чого зразок інкубували на льоду впродовж 30 хв. Розчин білка центрифугували при 14 000 об./хв і відбирали супернатант для подальших досліджень. Остаточну концентрацію білка в реакційній суміші перевіряли спектрофотометрично, і вона становила 88 мг/мл. Оцінку динаміки полімеризації FtsZ-білка та гідролізу ГТФ FtsZ-білком проводили в присутності відібраних під час скринінгу *in silico* гетероциклічних сполук в концентрації 50 мкМ. Як контроль використовували реакційні суміші, що містили відповідну кількість диметилсульфоксиду.

Спектрофотометричне визначення динаміки полімеризації FtsZ-білка *in vitro* здійснювали за допомогою спектрофотометра Specord 210 (AnalytikJena, Німеччина) в двопроменевому (*double-beam*) режимі, при довжині хвилі 340 нм (детектор 4 нм, крок сканування 5 с) впродовж 30 хв в термостатованому елементі Пелт'є тримачі для кювет при 37 °С. Полімеризація була індукована додаванням в реакційну суміш ГТФ до кінцевої концентрації 1 мМ. В кювету порівняння при двопроменевому режимі сканування вносили буфер для полімеризації без FtsZ-білка, що містив відповідний аналіт.

За результатами аналізу впливу 13-и гетероциклічних сполук на динамічні показники полімеризації FtsZ було виділено дві дискретні групи, що відрізнялися характером впливу на цей процес. Шість речовин, а саме F0478-0368; F0478-0449; F0478-0451; F0478-0497; B0106; B0231 не викликали помітного інгібіторного впливу на полімеризацію або вплив був незначний, деякі з наведених речовин мали значення рівня полімеризації навіть вище за контроль (рис. 6, див. кольорову вклейку). Так, серед даної групи речовин дві (B0106 та B0231) мали значення, близькі до контрольних, решта речовин (F0478-0368, F0478-0449, F0478-0451, F0478-0497) і особливо B0106 виявили значення, більші за контроль. Це, ймовірно, може бути пов'я-

зано зі здатністю даних речовин ініціювати утворення агрегатів білка, що в свою чергу мало наслідком підвищення оптичного поглинання.

Решту речовин (B0026, F0478-0505, B0036, B0156, F0478-0130, F0478-0175, F0478-0221) можна охарактеризувати як вірогідні інгібітори полімеризації FtsZ (полімеризація або мала мінімальні динамічні показники — B0026, B0036, B0156, F0478-0175, F0478-0221, або була нестабільною у часі, завершуючись деполімеризацією FtsZ — F0478-0505, F0478-0130) (рис. 7, див. кольорову вклейку).

Визначення ГТФ-азної активності FtsZ *in vitro*

Для визначення ГТФ-азної активності FtsZ-білків використовували набір PhosFree™ Phosphate Assay Biochem Kit (BK050, Cytoskeleton Ink., USA), дія якого ґрунтується на колориметричній реакції фосфату з малахітовим зеленим. Порівняння змін в концентраціях фосфатних іонів виконували в крайніх часових точках динаміки полімеризації FtsZ: 0 хв (одразу після додавання ГТФ із затримкою початку вимірювання на 15 с з врахуванням методичних маніпуляцій) та 30 хв. Реакцію проводили на водяній бані при 37 °С. Реакцію зупиняли препаратом перхлорної кислоти та вимірювали оп-

тичне поглинання при 650 нм. За допомогою калібрувальної кривої, побудованої шляхом титрування стандартного розчину фосфату, була визначена кількість PO_4^{3-} у мікромольному діапазоні, що вивільнюється при гідролізі ГТФ.

За результатами оцінки усі дослідні зразки виявили рівень гідролізу ГТФ, нижчий за контрольний (239 мкМ PO_4^{3-} при полімеризації 24,8 мкМ FtsZ в присутності 50 мМ ГТФ). Так, усі досліджені речовини пригнічували ГТФ-азну активність FtsZ-білка з різною ефективністю (від 4 до 28 %). Однак у випадку шести сполук-лідерів рівень інгібування ГТФ-азної активності сягав 18 % і вище: B0026 (28 %), F0478-0368 (24 %), F0478-0451 (20 %), F0478-0497 (24 %), F0478-0175 (27 %), F0478-0221 (19 %) (рис. 8, див. кольорову вклейку).

Порівнюючи результати двох експериментальних підходів серед дослідженої вибірки сполук було визначено три, що характеризуються найвищим інгібіторним ефектом (максимальне інгібування полімеризації та ГТФ-азної активності FtsZ-білка), а саме B0026 (2[(4-нітрофеніл)метилтіо]-1,3-бензотіазол), F0478-0175 ([2-(4-фторфеніл)-2-оксо-етил]2-(1,3-бензоксазол-2-ілтіо)ацетат) та F0478-0221 (8-індолін-1-ілсульфонілхінолін) (рис. 9). Таким чином, на підставі отриманих результатів дані речовини можна рекомендувати для подальшого дослідження їх впливу на апарат поділу *M. tuberculosis*.

Подібні властивості вищезазначених сполук були доведені вперше. Наразі обрані сполуки розглядаються нами як перспективні інгібітори FtsZ і будуть залучені у подальші дослідження з метою встановлення їх фармакологічного потенціалу як нових ліків проти туберкульозу. Крім того, встановлені особливості взаємодії сполук-лідерів з FtsZ-білком *M. tuberculosis* надають нам інформацію стосовно особливостей ліганд/білкової взаємодії (рис. 10). Отримана інформація є дуже важливою відправною точкою для подальшого дизайну і синтезу більш ефективних інгібіторів поділу клітин мікобактерій.

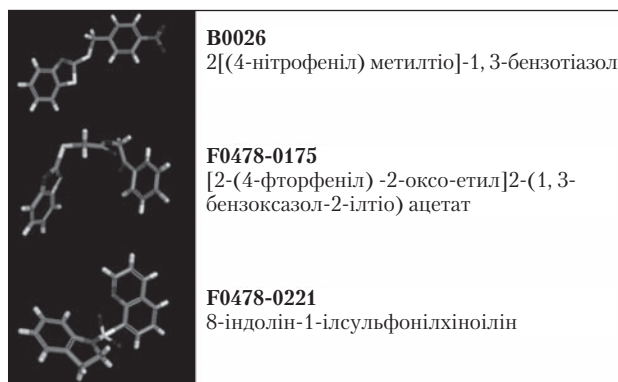
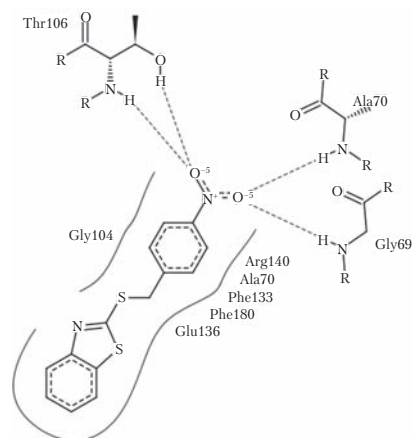
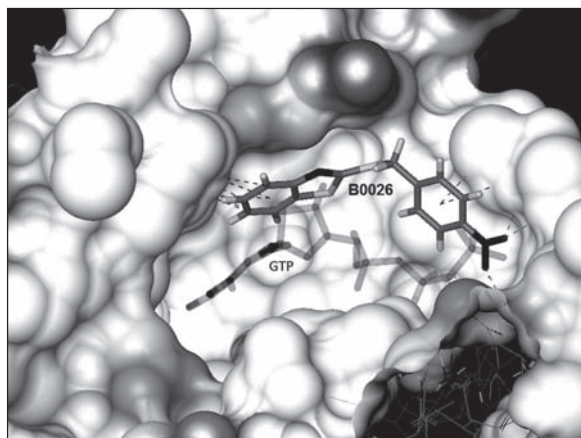
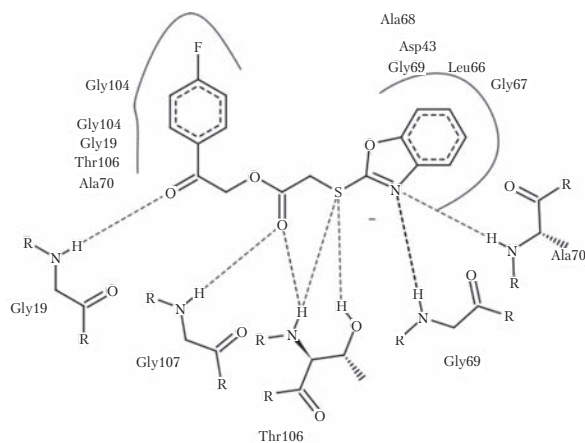
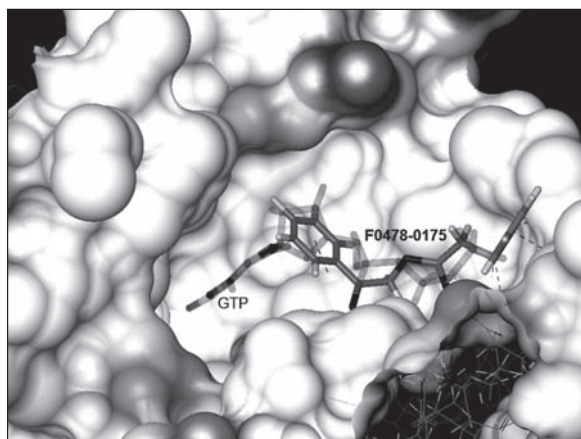


Рис. 9. Сполуки-лідери, відібрані на підставі даних молекулярного докінгу, молекулярної динаміки, а також за результатами експериментальної перевірки здатності до інгібування полімеризації і ГТФ-азної активності FtsZ білку *M. tuberculosis* в умовах *in vitro*

B0026 (2[(4-Нітрофеніл)метилтіо]-1,3-бензотіазол)



F0478-0175 ([2-(4-Фторфеніл)-2-оксо-етил]2-(1,3-бензоксазол-2-ілтіо)ацетат)



F0478-0221 (8-Індолін-1-ілсульфонілхінолін)

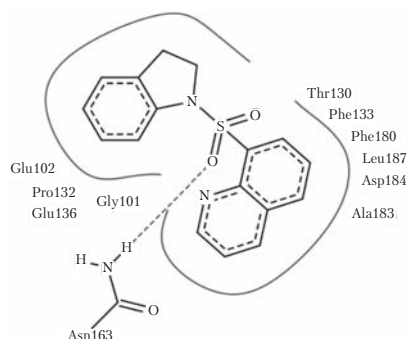
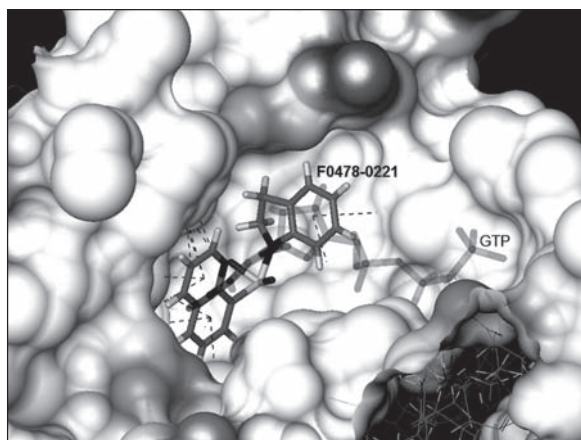


Рис. 10. Особливості ліганд-білкової взаємодії сполук-лідерів (B0026, F0478-0175, F0478-0221) з FtsZ-білком *M. tuberculosis*. Положення лігандів у ГТФ-обмінному сайті FtsZ-білка (ліворуч) і фармакофорні мапи ліганд-білкової взаємодії (праворуч). Контроль — молекула ГТФ

ВИСНОВКИ

У рамках реалізації ВО CSLabGrid, створеної в системі Українського Національного Гріда, було виконано пошук нових сполук з протитуберкульозною активністю. Поєднуючи методи структурної біоінформатики, обчислень у Грід і експериментів *in vitro* було розроблено метод ефективного високопропускового скринінгу сполук імідазольного ряду. Створені відповідні бібліотеки лігандів і молекулярних мішеней, які придатні для подальшого використання у дослідженнях ВО CSLabGrid. За результатами скринінгу бібліотеки лігандів, що нараховувала 2886 сполук, біоінформаційного і біохімічного аналізу було визначено три речовини, які водночас проявляють максимальне пригнічення полімеризації та ГТФ-азної активності (18–28 %) FtsZ-білка *Mycobacterium tuberculosis*, а саме В0026 (2[(4-нітрофеніл)метилтіо]-1,3-бензотіазол); F0478-0175 ([2-(4-фторфеніл)-2-оксо-етил]2-(1,3-бензоксазол-2-ілтіо)ацетат) та F0478-0221 (8-індолін-1-ілсульфонілхінолін).

Дослідження були підтримані проектом цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми створення нових речовин і матеріалів хімічного виробництва» (2012–13 рр.): «Пошук та оцінка протитуберкульозної активності нових сполук гетероциклічного ряду на основі структурно-біологічного докінгу та дизайну», (№ держреєстрації 0112U003389). Частина досліджень, безпосередньо пов'язана зі створенням баз даних і використанням обчислень у Грід, була підтримана проектом Державної цільової науково-технічної програми впровадження і застосування Грід-технологій на 2009–13 рр. «Використання Грід-технологій у фундаментальних та прикладних дослідженнях цитоскелету шляхом створення та розвитку віртуальної організації CSLabGrid» (2012 р., № держреєстрації 0112U004000).

ЛІТЕРАТУРА

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. — Електрон. дані. — Київ, 2012. — Режим доступу: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf.

2. Kumar K., Awasthi D., Berger W.T., Tonge P.J., Slayden R.A., Ojima I. Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ // *Future Med Chem.* — 2010. — 2 (8). — P. 1305–1323.
3. Основні засади організації медичної допомоги хворим на туберкульоз (посібник з організаційно-методичної роботи) / Ю. І. Фещенко, В. М. Мельник, В. Г. Матусевич, І.О. Новожилова, В.О. Юхимець, М.І. Линник / За ред. Ю. І. Фещенко, В. М. Мельника. — Електрон. дані. — Київ, 2012. — 156 с. — Режим доступу: <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2012/feschenko2012-1.pdf>.
4. Левцицька Н.А., Бажора Ю.І., Ніколаєвський В.В., Асмолов О.К. Медикаментозна резистентність мікобактерії туберкульозу, що були виділені від хворих в миколаївській області України протягом 2000–2002 рр. // Український пульмонологічний журнал. — 2003. — №4. — С. 17–20.
5. Черенько С. Туберкульоз — хвороба соціальна // УНІАН Здоров'я. — 2008. — 77. — С. 9–18.
6. de Colombani P., Veen J. (Ed.) Review of the National Tuberculosis Programme in Ukraine. 10–22 October 2010., WHO Regional Office for Europe // World Health Organization. — 2011. — P. 69.
7. Musser J.M., Amin A., Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure // *Genetics.* — 2000. — 155 (1). — P. 7–16.
8. Hudson A., Imamura T., Gutteridge W., Kanyok T., Nunn P. The current anti-TB drug search and development pipeline. — TDR/PRD/TB/03.1W, 2003. — Режим доступу: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/anti-tb-drug.pdf>.
9. Tripathi R.P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V.K. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges // *Med Res Rev.* — 2005. — 25 (1). — P. 93–131.
10. Pavan F.R., Sato D.N., Higuchi C.T., Santos A.C.B., Vilegas W., Leite, C.Q.F. In vitro anti-Mycobacterium tuberculosis activity of some Brazilian «Cerrado» plants // *Revista Brasileira de Farmacognosia.* — 2009. — 19. — P. 204–206.
11. Mani N., Gross C.H., Parsons J.D., Hanzelka B., Müh U., Mullin S., Liao Y., Grillot A.L., Stamos D., Charifson P.S., Grossman T.H. In vitro characterization of the antibacterial spectrum of novel bacterial type II topoisomerase inhibitors of the aminobenzimidazole class // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2006. — 50 (4). — P. 1228–1237.
12. Grossman T.H., Bartels D.J., Mullin S., Gross C.H., Parsons J.D., Liao Y., Grillot A.L., Stamos D., Olson E.R., Charifson P.S., Mani N. Dual targeting of GyrB and ParE by a novel aminobenzimidazole class of antibacterial compounds // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2007. — 51 (2). — P. 657–666.

13. Брыцун В.Н., Карпов П.А., Емец А.И., Лозинский М.О., Блюм Я.Б. Протиготуберкулезные свойства производных имидазола и бензимидазола // Ж. орг. та фарм. химии. — 2011. — **9** (3, 35). — P. 3–14.
14. Koch A., Mizrahi V., Warner D.F. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? // Emerging Microbes & Infections, 2014. — **3** (e17). — P. doi:10.1038/emi.2014.17.
15. Loose M., Mitchison T.J. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns // Nature Cell Biology. — 2014. — **16**. — P. 38–46.
16. Chen Y., Anderson D.E., Rajagopalan M., Erickson H.P. Assembly dynamics of Mycobacterium tuberculosis // FtsZ. — J Biol Chem. — 2007. — **282** (38). — P. 27736–27743.
17. White E.L., Ross L.J., Reynolds R.C., Seitz L.E., Moore G.D., Borhani D.W. Slow polymerization of Mycobacterium tuberculosis FtsZ // J Bacteriol. — 2000. — **182** (14). — P. 4028–4034.
18. Kapoor S., Panda D. Targeting FtsZ for antibacterial therapy: a promising avenue // Expert Opin Ther Targets. — 2009. — **13** (9). — P. 1037–1051.
19. MacDonald L.M., Armson A., Thompson A.R., Reynoldson J.A. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum* // Mol Biochem Parasito. — 2004. — **138** (1). — P. 89–96.
20. Robinson M.W., McFerran N., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement // J. Mol. Graph. Model. — 2004. — **23** (3). — P. 275–284.
21. Sambanthamoorthy K., Gokhale A.A., Lao W., Parashar V., Neiditch M.B., Semmelhack M.F., Lee I., Waters C.M. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner // Antimicrob Agents Chemother. — 2011. — **55** (9). — P. 4369–4378.
22. Küçükbay H., Durmaz R., Okuyucu N., Günel S., Kazaz C. Synthesis and antibacterial activities of new bis-benzimidazoles // Arzneimittelforschung. — 2004. — **54** (1). — P. 64–68.
23. Карпов П.А., Демчуик О.М., Блуме Я.Б., Брысун В.М., Волохнык Д.М. Discovery of new anti-TB compounds that target Mycobacterial FtsZ: highthroughput screening and molecular docking / Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13), Moscow, Russia, July 25–28. — 2013. — P.223–224.
24. Adams D.W., Errington J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring // Nat. Rev. Microbiol. — 2009. — **7**. — P. 642–653.
25. Blaauwen T.D.E.N., Buddelmeijer N., Hameete C.O.R.M., Nanninga N. Timing of FtsZ Assembly in Escherichia coli // J. of Bacteriology. — 1999. — **181**. — P. 5167–5175.
26. Goehring N.W., Beckwith J. Diverse Paths to Midcell: Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery // Current Biology. — 2005. — **15** (13). — P. R514–R526.
27. Hong W., Deng W., Xie J. The Structure, Function, and Regulation of Mycobacterium FtsZ // Cell Biochem Biophys. — 2013. — **65** (2). — P. 97–105.
28. Król E., Scheffers D. FtsZ Polymerization Assays: Simple Protocols and Considerations // J. of Visualized Experiments. — 2013. — **81**. — P. 1–13.
29. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Design of specific cytoskeleton related biological database and data management environment for bioinformatical cytoskeleton investigation and collaboration within virtual Grid-organisation. Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11), July 21–24, Moscow, Russia. — 2011— P. 297–298.
30. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Hardware environment for CSLabGrid: Reaching maximum efficacy of computations in structural biology and bioinformatics / Second Intern. Conf. «Cluster Computing» CC 2013, June 3–5, 2013, Ukraine, Lviv. — 06/2013. — P.191–194.
31. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. On the Efficiency of CPU and Hybrid CPU-GPU Systems in Computational Biology Tasks / Comp. Science and Applic. (Ethan Publishing Company). — 2014. — **1** (1). — P. 48–59.
32. Karpov P.A., Bryrsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of Virtual Organization CSLabGrid // Nauka i innovacii (Science and Innovation). — 2015. — **11** (1). — P. 92–100 [in Ukrainian].
33. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C.M., Harris D.E., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. III, Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // Nature. — 1998. — **393**. — P. 537–544.
34. Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J.D., DeBoy R.T., Dodson R.J., Gwinn M.L., Haft D.H., Hickey E.K., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M.D., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T.R., Fraser C.M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains // J. Bacteriol. — 2002. — **184**. — P. 5479–5490.
35. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. — 2008. — **36**. — P. 190–195.
36. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. — 1997. — **18** (15). — P. 2714–2723.

37. *Esvar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M.Y., Pieper U., Sali A.* Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER / *Cur Prot in Bioinform* / John Wiley & Sons, Inc. – 2006, Sup.15. – P. 5.6.1–5.6.30.
38. *Roy A., Kucukural A., Zhang Y.* I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction // *Nature Protocols*. – 2010. – **5**. – P. 725–738.
39. *Roy A., Yang J., Zhang Y.* COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation // *Nucl. Acids Res.* – 2012. – **40**. – P. W471–W477.
40. *Kuntal B.K., Aparoy P., Reddanna P.* EasyModeller: A graphical interface to MODELLER // *BMC Res Notes*. – 2010. – **3** (226). doi: 10.1186/1756-0500-3-226.
41. *Melo F., Feytmans E.* Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy // *J. Mol. Biol.* – 1998. – **277**. – P. 1141–1152.
42. *Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures // *J. Appl. Cryst.* – 1993. – **26**. – P. 283–291.
43. *Chen V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2010. – **66** (Pt.1). – P. 12–21.
44. *Eisenberg D., Lüthy R., Bowie J.U.* VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles // *Methods Enzymol.* – 1997. – **277**. – P. 396–404.
45. *Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A., Michielin O.* SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules // *J. Comput. Chem.* – 2011. – **32** (11). – P. 2359–2368.
46. *Verdonk M.L., Cole J.C., Hartshorn M.J., Murray C.W., Taylor R.D.* Improved protein-ligand docking using GOLD // *Proteins*. – 2003. – **52** (4). – P. 609–623.
47. *Hartshorn M.J., Verdonk M.L., Chessari G., Brewerton S.C., Mooij W.T., Mortenson P.N., Murray C.W.* Diverse, High-Quality Test Set for the Validation of Protein-Ligand Docking Performance // *J. Med. Chem.* – 2007. – **50**. – P. 726–741.
48. *Huang S.-Y., Zou X.* Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking // *Int. J. Mol. Sci.* – 2010. – **11**. – P. 3016–3034.
49. *Schneider N., Lange G., Hindle S., Klein R., Rarey M.* A consistent description of HYdrogen bond and DEhydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2013. – **27** (1). – P. 15–29.
50. *Schneider N., Hindle S., Lange G., Klein R., Albrecht J., Briem H., Beyer K., Claußen H., Gastreich M., Lemmen C., Rarey R.* Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* – 2012. – **26**. – P. 701–723.
51. *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** (3). – P. 435–447.
52. *Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. – 2013. – **29** (7). – P.845–854.
53. *Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D.Jr.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields // *J. Comput. Chem.* – 2009. – **31** (4). – P. 671–690.
54. *Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H, Pedersen L.G.* A smooth particle-mesh Ewald potential // *J. Chem. Phys.* – 1995. – **103** (19). – P. 8577–8592.
55. *Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations // *J. Comput. Phys.* – 1997. – **18**. – P. 1463–1472.
56. *Almlöf M., Brandsdal B.O., Aqvist J.* Binding affinity prediction with different force fields: examination of the linear interaction energy method // *J. Comput. Chem.* – 2004. – **25** (10). – P. 1242–1254.
57. *Stacklies W., Seifert C., Graeter F.* Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – **12** (101). – P. 1–5.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report. Kyiv, 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf.
2. Kumar K., Awasthi D., Berger W.T., Tonge P.J., Slayden R.A., Ojima I. Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Med Chem.* 2010, 2(8): 1305–1323.
3. *Osnovni zasady organizacii' medychnoi' dopomogy hvo-rym na tuberkul'oz* (posibnyk z organizacijno-metodychnoi' roboty). Ju. I. Feshhenko, V. M. Mel'nyk, V. G. Matusevych, I.O. Novozhylova, V.O. Juhymec', M.I. Lynnyk. Za red. Ju. I. Feshhenka, V. M. Mel'nyka. Elektron. dani. Kyiv, 2012. <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2012/feschenko2012-1.pdf> [in Ukrainian].

4. Levyc'ka N.A., Bazhora Ju.I., Nikolajevs'kyj V.V., Asmolov O.K. Medykamentozna rezystentnist' mikobakterij tuberkul'ozu, shho buly vydileni vid hvoryh v mykolai'vs'kij oblasti Ukraїny protjagom 2000–2002. *Ukraїns'kij pul'monologichnyj zhurnal*. 2003, 4: 17–20 [in Ukrainian].
5. Cheren'ko C. Tuberkul'oz – hvoroba social'na. UNIAN. *Zdorov'ja*. 2008, 77: 9–18 [in Ukrainian].
6. de Colombani P., Veen J. (Ed.) Review of the National Tuberculosis Programme in Ukraine. 10–22 October 2010, WHO Regional Office for Europe. *World Health Organization*. 2011.
7. Musser J.M., Amin A., Ramaswamy S. Negligible genetic diversity of mycobacterium tuberculosis host immune system protein targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics*. 2000, 155(1): 7–16.
8. Hudson A., Imamura T., Gutteridge W., Kanyok T., Nunn P. The current anti-TB drug search and development pipeline. *TDR/PRD/TB/03.1W*. 2003: <http://www.who.int/tdr/publications/documents/anti-tb-drug.pdf>.
9. Tripathi R.P., Tewari N., Dwivedi N., Tiwari V.K. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. *Med Res Rev*. 2005, 25(1): 93–131.
10. Pavan F.R., Sato D.N., Higuchi C.T., Santos A.C.B., Vilegas W., Leite, C.Q.F. *In vitro* anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian “Cerrado” plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009, 19: 204–206.
11. Mani N., Gross C.H., Parsons J.D., Hanzelka B., Müh U., Mullin S., Liao Y., Grillot A.L., Stamos D., Charifson P.S., Grossman T.H. *In vitro* characterization of the antibacterial spectrum of novel bacterial type II topoisomerase inhibitors of the aminobenzimidazole class. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006, 50(4): 1228–1237.
12. Grossman T.H., Bartels D.J., Mullin S., Gross C.H., Parsons J.D., Liao Y., Grillot A.L., Stamos D., Olson E.R., Charifson P.S., Mani N. Dual targeting of GyrB and ParE by a novel aminobenzimidazole class of antibacterial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007, 51(2): 657–666.
13. Brycun V.N., Karpov P.A., Emec A.I., Lozinskij M.O., Bljum Ja.B. Protivotuberkuleznye svojstva proizvodnyh imidazola i benzimidazola. *Zhurnal org. ta farm. himii*. 2011, 9(3, 35): 3–14 [in Russian].
14. Koch A., Mizrahi V., Warner D.F. The impact of drug resistance on Mycobacterium tuberculosis physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging Microbes & Infections*. 2014, 3(e17): doi:10.1038/emi.2014.17.
15. Loose M., Mitchison T.J. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nature Cell Biology*. 2014, 16: 38–46.
16. Chen Y., Anderson D.E., Rajagopalan M., Erickson H.P. Assembly dynamics of Mycobacterium tuberculosis FtsZ. *J Biol Chem*. 2007, 282(38): 27736–27743.
17. White E.L., Ross L.J., Reynolds R.C., Seitz L.E., Moore G.D., Borhani D.W. Slow polymerization of Mycobacterium tuberculosis FtsZ. *J Bacteriol*. 2000, 182(14): 4028–4034.
18. Kapoor S., Panda D. Targeting FtsZ for antibacterial therapy: a promising avenue. *Expert Opin Ther Targets*. 2009, 13(9): 1037–1051.
19. MacDonald L.M., Armson A., Thompson A.R., Reynoldson J.A. Characterisation of benzimidazole binding with recombinant tubulin from *Giardia duodenalis*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Cryptosporidium parvum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004, 138(1): 89–96.
20. Robinson M.W., McFerran N., Trudgett A., Hoey L., Fairweather I. A possible model of benzimidazole binding to beta-tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *J. Mol. Graph. Model*. 2004, 23(3): 275–284.
21. Sambanthamoorthy K., Gokhale A.A., Lao W., Parashar V., Neiditch M.B., Semmelhack M.F., Lee I., Waters C.M. Identification of a novel benzimidazole that inhibits bacterial biofilm formation in a broad-spectrum manner. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011, 55(9): 4369–4378.
22. Küçükbay H., Durmaz R., Okuyucu N., Günel S., Kazaz C. Synthesis and antibacterial activities of new bis-benzimidazoles. *Arzneimittelforschung*. 2004, 54(1): 64–68.
23. Karpov P.A., Demchuyk O.M., Blume Ya.B., Britsun V.M., Volochnyk D.M. Discovery of new anti-TB compounds that target Mycobacterial FtsZ: highthroughput screening and molecular docking. *Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'13)*. Moscow, Russia July 25–28. 2013: 223–224.
24. Adams D.W., Errington J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat. Rev. Microbiol*. 2009, 7: 642–653.
25. Blaauwen T.D.E.N., Buddelmeijer N., Hameete C.O.R.M., Nanninga N. Timing of FtsZ Assembly in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 1999, 181: 5167–5175.
26. Goehring N.W., Beckwith J. Diverse Paths to Midcell: Assembly of the Bacterial Cell Division Machinery. *Current Biology*. 2005, 15(13): R514–R526.
27. Hong W., Deng W., Xie J. The Structure, Function, and Regulation of Mycobacterium FtsZ. *Cell Biochem Biophys*. 2013, 65(2): 97–105.
28. Król E., Scheffers D. FtsZ Polymerization Assays : Simple Protocols and Considerations. *Journal of Visualized Experiments*. 2013, 81: 1–13.
29. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Design of specific cytoskeleton related biological database and data management environment for bioinformatical cytoskeleton investigation and collaboration within virtual Grid-organisation. Proceedings of the International Moscow Conference on Computational Molecular Biology (MCCMB'11). July 21–24, 2011, Moscow, Russia: 297–298.

30. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. Hardware environment for CSLabGrid: Reaching maximum efficacy of computations in structural biology and bioinformatics. *Second International Conference "Cluster Computing" CC 2013* (Ukraine, Lviv, June 3-5, 2013), Ukraine, Lviv; 06/2013: 191–194.
31. Pydiura N., Karpov P., Blume Ya. On the Efficiency of CPU and Hybrid CPU-GPU Systems in Computational Biology Tasks. *Computer Science and Applications (Ethnan Publishing Company)*. 2014, 1(1): 48–59.
32. Karpov P.A., Bryrsun V.M., Rayevsky A.V., Demchuk O.M., Pydiura N.O., Ozheredov S.P., Samofalova D.A., Spivak S.I., Yemets A.I., Kalchenko V.I., Blume Ya.B. High-throughput screening of new antimetabolic compounds based on potential of Virtual Organization CSLabGrid. *Nauka i innovacii (Science and Innovation)*. 2015, 11(1): 92–100 [in Ukrainian].
33. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C.M., Harris D.E., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E. III, Teakaia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R.M., Devlin K., Barrell B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998, 393: 537–544.
34. Fleischmann R.D., Alland D., Eisen J.A., Carpenter L., White O., Peterson J.D., DeBoy R.T., Dodson R.J., Gwinn M.L., Haft D.H., Hickey E.K., Kolonay J.F., Nelson W.C., Umayam L.A., Ermolaeva M.D., Salzberg S.L., Delcher A., Utterback T.R., Fraser C.M. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* 2002, 184: 5479–5490.
35. The UniProt Consortium. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucl. Acids Res.* 2008, 36: 190–195.
36. Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997, 18(15): 2714–2723.
37. Eswar N., Marti-Renom M.A., Webb B., Madhusudhan M.S., Eramian D., Shen M.Y., Pieper U., Sali A. Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Cur Prot in Bioinform, John Wiley & Sons, Inc.* 2006. Sup.15: 5.6.1–5.6.30.
38. Roy A., Kucukural A., Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*. 2010, 5: 725–738.
39. Roy A., Yang J., Zhang Y. COFACTOR: An accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucl. Acids Res.* 2012, 40: W471–W477.
40. Kuntal B.K., Aparoy P., Reddanna P. EasyModeller: A graphical interface to MODELLER. *BMC Res Notes*. 2010, 3(226). doi: 10.1186/1756-0500-3-226.
41. Melo F., Feytmans E. Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy. *J. Mol. Biol.* 1998, 277: 1141–1152.
42. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 1993, 26: 283–291.
43. Chen V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2010, 66(Pt.1): 12–21.
44. Eisenberg D., Lüthy R., Bowie J.U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol.* 1997, 277: 396–404.
45. Zoete V., Cuendet M.A., Grosdidier A., Michielin O. SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *J. Comput. Chem.* 2011, 32(11): 2359–2368.
46. Verdonk M.L., Cole J.C., Hartshorn M.J., Murray C.W., Taylor R.D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins*. 2003, 52(4): 609–623.
47. Hartshorn M.J., Verdonk M.L., Chessari G., Brewerton S.C., Mooij W.T., Mortenson P.N., Murray C.W. Diverse, High-Quality Test Set for the Validation of Protein-Ligand Docking Performance. *J. Med. Chem.* 2007, 50: 726–741.
48. Huang S.-Y., Zou X. Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11: 3016–3034.
49. Schneider N., Lange G., Hindle S., Klein R., Rarey M. A consistent description of Hydrogen bond and Dehydration energies in protein–ligand complexes: methods behind the HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2013, 27(1): 15–29.
50. Schneider N., Hindle S., Lange G., Klein R., Albrecht J., Briem H., Beyer K., Claußen H., Gastreich M., Lemmen C., Rarey R. Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2012b, 26: 701–723.
51. 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(3): 435–447.
52. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*. 2013, 29(7): 845–854.
53. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A.D.Jr. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 2009, 31(4): 671–690.
54. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. A smooth particle-mesh Ewald potential. *J. Chem. Phys.* 1995, 103(19): 8577–8592.

55. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Phys.* 1997, 18: 1463–1472.
56. Almlöf M., Brandsdal B.O., Aqvist J. Binding affinity prediction with different force fields: examination of the linear interaction energy method. *J. Comput. Chem.* 2004, 25(10): 1242–1254.
57. Stacklies W., Seifert C., Graeter F. Implementation of force distribution analysis for molecular dynamics simulations. *BMC Bioinformatics.* 2011, 12(101): 1–5.

*P.A. Karpov¹, O.M. Demchuk¹, V.N. Britsun²,
D.I. Lytvyn¹, N.O. Pydiura¹, A.V. Rayevsky¹,
D.A. Samofalova¹, S.I. Spivak¹, D.M. Volochnyuk²,
A.I. Yemets¹, Ya.B. Blume¹*

¹Institute of Food Biotechnology and Genomics,
the NAS of Ukraine, Kyiv

²Institute of Organic Chemistry,
the NAS of Ukraine, Kyiv

NEW IMIDAZOLE INHIBITORS
OF MYCOBACTERIAL FtsZ:
THE WAY FROM HIGH-THROUGHPUT
MOLECULAR SCREENING IN GRID
UP TO *in vitro* VERIFICATION

In the framework of UNG virtual organization CSLab-Grid, high-throughput molecular screening was performed for new anti-TB compounds. Using program FlexX installed on IFBG Cluster and models of four perspective ligand binding sites on the surface of FtsZ of *Mycobacterium tuberculosis*, virtual screening was performed for database containing 2886 compounds synthesized in the Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine. Based on LE and ΔG score, docking scores of CCDC Gold, and results of molecular dynamics, we selected a group of perspective FtsZ inhibitors. *In vitro* validation have revealed 6 compounds with the highest inhibition of GTPase activity of FtsZ. Also, based on *in vitro* experiment, we have selected three compounds exhibiting both - strong inhibi-

tion of FtsZ polymerization and inhibition of GTPase activity.

Keywords: tuberculosis, structural biology, bioinformatics, high-throughput screening (HTS), *in vitro*.

*П.А. Карпов¹, О.М. Демчук¹, В.Н. Брыцун², Д.И. Литвин¹,
Н.А. Пыдюра¹, А.В. Раевский¹, Д.А. Самофалова¹,
С.И. Спивак¹, Д.М. Волочнюк², А.И. Емец¹, Я.Б. Блум¹*

¹Институт пищевой биотехнологии и геномики
НАН Украины, Киев

²Институт органической химии НАН Украины, Киев

НОВЫЕ ИМИДАЗОЛЬНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ
КАК ИНГИБИТОРЫ FtsZ-БЕЛКОВ
МИКОБАКТЕРИЙ: ОТ ВИСОКОПРОПУСКОВОГО
МОЛЕКУЛЯРНОГО СКРИНИНГА В Грід
ДО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНАЛИЗА *in vitro*

В рамках реализации главной цели созданной в УНГ виртуальной организации CSLabGrid был выполнен поиск новых противотуберкулезных соединений. С использованием установленной на IFBG Cluster программы Flex и модели четырех перспективных сайтов связывания лигандов на поверхности FtsZ-белка *Mycobacterium tuberculosis* было выполнено скрининг базы данных, которая содержала 2886 соединений, синтезированных в Институте органической химии НАН Украины. На основании показателей LE и ΔG , результатов докинга в программе CCDC Gold и обсчета молекулярной динамики комплексов была отобрана группа перспективных ингибиторов Fts. Во время экспериментальной проверки *in vitro* шесть веществ проявили высочайшую эффективность ингибирования ГТФ-азной активности FtsZ-белка. Также по результатам экспериментальной оценки *in vitro* было избрано три вещества, которые одновременно проявляют максимальное угнетение полимеризации и ГТФ-азной активности FtsZ-белка.

Ключевые слова: туберкулез, структурная биология, биоинформатика, виртуальный скрининг, *in vitro*.

Стаття надійшла до редакції 17.02.16