

УДК 577(11+151+181)

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К МОЛЕКУЛЯРНОМУ МОДЕЛИРОВАНИЮ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ С БЕТА-ЛАКТАМАЗАМИ НА ПРИМЕРЕ ГУМИНОПОДОБНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНАЛОГОВ*

© С.А. Владимиров**, Г.Д. Рухович, Е.В. Радченко, И.В. Перминова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3,
vladimirof.work@gmail.com

Для защиты бета-лактамовых антибиотиков от действия резистентных бактерий используются ингибиторы β -лактамаз. Однако из-за появления устойчивости к β -лактамам ингибиторам поиск новых ингибиторов небета-лактамовой природы является актуальной задачей. В данной работе в качестве нового источника ингибиторов бета-лактамаз рассматриваются природные гуминовые вещества (ГВ). Ранее мы сообщали о способности гуминовых кислот угля и их узких фракций ингибировать β -лактамазы TEM-1. Цель данной работы состояла в изучении механизма взаимодействия молекулярных компонентов гуминовых веществ с применением методов молекулярного моделирования. Отбор гуминоподобных молекул осуществляли с помощью метода дерепликации на основании известной ингибирующей активности фракции ГВ и ее молекулярного состава, найденного методом масс-спектрометрии высокого разрешения. Моделирование взаимодействия отобранных молекул с белком бета-лактамазы вели методами докинга и молекулярной динамики с использованием ПО Chimera v.1.15. и Amber14. В результате дерепликации было идентифицировано 156 уникальных структур, из которых отобраны три. Результаты моделирования показали, что наиболее вероятным механизмом взаимодействия ГВ с бета-лактамазой является неконкурентное ингибирование в результате связывания с аллостерическим сайтом белка. Кроме того, возможна неспецифическая агрегация на поверхности белка, которая так же объясняет синергетическое действие на сульбактам путем стерического блокирования его в активном сайте. Показана перспективность применения метода дерепликации для изучения молекулярных механизмов биологической активности гуминовых веществ.

Ключевые слова: ингибиторы бета-лактамаз, гуминовые вещества, молекулярное моделирование, дерепликация, докинг, молекулярная динамика.

Для цитирования: Владимиров С.А., Рухович Г.Д., Радченко Е.В., Перминова И.В. Разработка подходов к молекулярному моделированию взаимодействия биологически активных компонентов гуминовых веществ с бета-лактамазами на примере гуминоподобных низкомолекулярных аналогов // Химия растительного сырья. 2024. №2. С. 329–339. DOI: 10.14258/jcprm.20240213955.

Введение

Антибиотики на основе β -лактамов имеют доказанную эффективность в борьбе с широким спектром бактериальных инфекций и являются наиболее широко применяемым классом антибиотиков [1]. Однако вследствие распространения резистентности патогенов антибиотики теряют эффективность. Ежегодно во всем мире в результате устойчивости к антибиотикам погибает около 700 000 человек [2]. Основными механизмами устойчивости к антибиотикам являются [3]: уменьшение проницаемости клеточной стенки, образование эффлюксных насосов, мутирование и модификация мишеней антибиотиков и инактивация антибиотиков. Для наиболее широко распространенных бета-лактамовых антибиотиков наиболее широкое распростране-

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20240213955s

** Автор, с которым следует вести переписку.

ние получил механизм инактивации, вызванный действием сериновых β -лактамаз класса А [4]. Данные гидролитические ферменты расщепляют амидную связь β -лактаманного кольца, в результате чего теряется активность антибиотика [5].

Для защиты бета-лактаманых антибиотиков в состав антибактериальных композиций стали вводить ингибиторы β -лактамаз – структурные аналоги β -лактаманых антибиотиков. К числу клинически опробованных ингибиторов относятся клавулановая кислота, сульбактам, тазобактам [6]. Ингибиторы образуют прочные ковалентные связи с аминокислотными остатками активного центра фермента, например, с группой Ser 70, с помощью которой и осуществляется гидролиз антибиотиков сериновыми бета-лактамазами TEM-1 [7-9]. В результате бета-лактамаза теряет способность расщеплять бета-лактаманное кольцо [10]. Однако с появлением мутантных форм сериновых β -лактамаз, устойчивых к β -лактаманым ингибиторам, клиническая эффективность комбинированных препаратов резко снизилась [11]. Это сделало актуальным поиск новых ингибиторов β -лактамаз, в особенности небета-лактаманной природы.

В данной работе в качестве нового источника ингибиторов бета-лактамаз рассматриваются природные биологически активные соединения – гуминовые вещества (ГВ). ГВ образуются в результате гумификации (разложения) отмершей растительной биомассы. По химической природе ГВ представляют собой супрамолекулярные ансамбли продуктов окисления растительных биополимеров: лигнина, полисахаридов, белков, таннинов, терпеноидов и др. [12–14]. Ранее нами было показано, что природные ГВ и их узкие фракции проявляют ингибирующую активность в отношении β -лактамаз, а также оказывают синергетическое действие в отношении сульбактама при их совместном присутствии [15]. При этом выраженность их ингибирующего эффекта возрастает по мере увеличения гидрофобности фракции. Подобные зависимости мы наблюдали и для антивирусной активности ГВ: максимальную активность проявляли наиболее гидрофобные фракции и препараты гуминовых кислот, а минимальную – фульвокислоты и водорастворимое органическое вещество мумие [16, 17]. На способность ГВ неспецифически взаимодействовать с различными белками, включая ферменты, указывают и другие авторы [18–20]. В то же время сведения о типах и характере таких взаимодействий в литературе отсутствуют.

В поиске подходов к идентификации молекулярных носителей биологической активности в составе многокомпонентного ансамбля ГВ в работе [21] было впервые предложено использовать для этой цели методы хемоинформатики, а именно метод дерепликации, широко применяемый в фитохимии [22]. Метод дерепликации основан на решении «обратной задачи» идентификации, а точнее, поиск неизвестных структур соединений производится по известному типу активности этих соединений. Для этого на основании информации о типе и уровне биологической активности исследуемых (неизвестных) молекул (например, значение EC50 или индекс селективности к данному белку или вирусу) производится поиск структур известных (описанных в базе данных ChEMBL) молекул с заданным типом и уровнем биологической активности. Это позволяет сформировать весь пул структур известных соединений с заданным типом активности. Затем на основании дополнительной структурной информации по неизвестным молекулам (например, с использованием найденных для них брутто-формул методом масс-спектрометрии высокого разрешения) производится их сопоставление с аналогичным пулом данных для известных молекул из базы данных ChEMBL. Результаты пересечения двух множеств позволяют формировать пул наиболее вероятных структур для биологически активных «неизвестных» молекул.

В представленной работе мы применили метод дерепликации для поиска «гуминоподобных» молекул в базе данных ChEMBL с заданной активностью к ингибированию бета-лактамаз. Отобранные структуры были затем использованы для молекулярного моделирования их взаимодействия с ферментом бета-лактамазой методами докинга и молекулярной динамики.

Методы

Дерепликация гуминоподобных ингибиторов с использованием базы данных ChEMBL и генерация конформаций найденных молекул. Для дерепликации использовали данные о молекулярном составе наиболее активной фракции ГВ, полученные методом масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) [15]. Данные о молекулярном составе были получены в виде брутто-формул компонентов фракции ГВ. Масс-лист соединений приведен в таблице электронного приложения к статье. В базе данных ChEMBL был произведен поиск структур соединений, обладающих способностью ингибиро-

вать β -лактамазы TEM-1. Найденный пул соединений приведен на рисунке в электронном приложении к статье. С помощью метода дерепликации [21, 22] проводили сопоставление брутто-формул ГВ и найденных в базе данных ChEMBL соединений с известной структурной формулой и активностью.

Генерация конформаций трехмерных структур лигандов по найденным последовательностям SMILES осуществлялась в UCSF Chimera v.1.15. со встроенным модулем распознавания, разработанным в Национальном институте онкологии США (National Cancer Institute CADD group). Генерация трехмерных структур данным сервисом включает в себя два этапа: создание трехмерной структуры с использованием стохастических методов построения и оптимизация геометрии структуры с использованием силового поля MMFF94[23-24].

Дополнительная оптимизация геометрии «гуминоподобных» молекул и потенциальных ингибиторов β -лактамазы осуществлялась вручную в UCSF Chimera v.1.15 [25] с использованием силового поля GAFF [26] путем минимизации энергии структуры методом скорейшего спуска и методом градиентов.

Молекулярный докинг в системе гуминоподобный лиганд – β -лактамаза TEM-1. Молекулярный докинг проводили с использованием модуля Chimera Autodock Vina Tool в программе Chimera (v1.14). Chimera (v1.14). Устанавливали следующие параметры по белку: 1) добавлены все водороды в структуру белка, 2) удалены молекулы воды в процессе докинга. Для моделирования поведения гуминоподобных молекул и сульбактама были использованы следующие параметры: 1) добавлены водороды в структуры сульбактама за исключением депротонированной карбоксильной группы.

Докинг сульбактама в активный сайт белка (PDBid: 1XPB) проводили с образованием бокса с размерами $12 \times 27 \times 14 \text{ \AA}^3$ (рис. 1).

Результатом проведения докинга является получение 10 возможных конформаций лиганда в активном сайте с соответствующими аффинностями связывания с рецептором. Для дальнейшей работы использовали конформацию лиганда с наибольшей аффинностью к сайту связывания.

Молекулярная динамика в системе гуминоподобный лиганд – β -лактамаза TEM-1. Молекулярная динамика проводилась с использованием программного обеспечения Amber14 на вычислительных мощностях Лаборатории медицинской химии МГУ имени М.В. Ломоносова.

Минимизация энергии системы происходила в два этапа. Сначала была проведена минимизация энергии молекул воды вокруг молекулы бета-лактамазы – 100 шагов методом скорейшего спуска и 900 шагов методом градиентов. Дальнейшая минимизация энергии системы проводилась при снятии ограничений подвижности с аминокислотных остатков белка: было проведено 500 шагов методом скорейшего спуска и 4500 шагов методом градиентов.

Следующим этапом МД было постепенное нагревание системы, которое проводилось в три последовательных этапа. Ключевыми параметрами нагревания системы на первом этапе было постепенное увеличение температуры с 0 до 100 К. Длина траектории данного этапа равна 0.02 нс. Дальнейшее нагревание системы проводилось при температуре 298 К. Длина траектории составляла 0.1 нс. Последующую эквilibрацию системы проводили также при температуре 298 К, но без накладывания ограничений на подвижность тяжелых атомов структуры. Длина траектории данного этапа равна 0.2 нс.

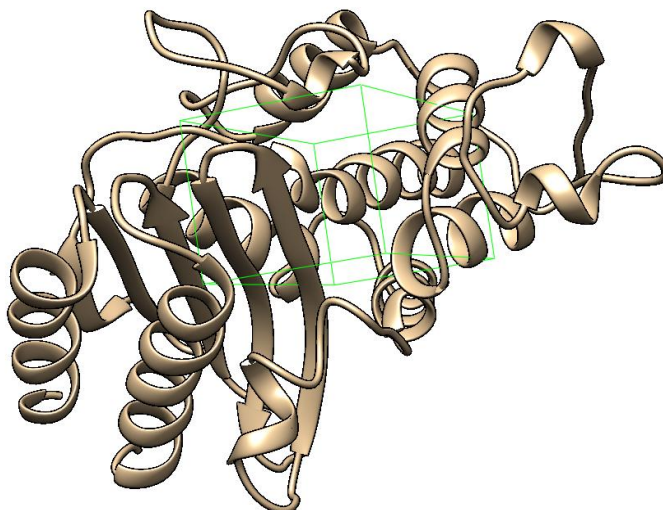


Рис. 1. Визуализация координатного бокса для молекулярного докинга белка – бета-лактамазы TEM-1

Заключительным этапом было накопление траектории МД. Расчеты проводили при температуре 298 К без ограничений на подвижность тяжелых атомов. МД расчеты были индивидуальными для каждого эксперимента и длились 40 нс для гуминоподобных лигандов и 100 нс для систем, содержащих β -лактамазу.

Общими для всех экспериментов являлись следующие характеристики:

- моделирование растворителя для каждого из экспериментов проводилось с использованием алгоритма TIP3PBOX со значением 15;
- моделирование реакции проводилось в растворителе с NaCl, концентрация которого равнялась 150 мМ, что имитирует концентрацию NaCl в клетках;
- уравнивание заряда противоионов проводилось эквивалентным количеством ионов Na^+ .

Результаты и их обсуждение

В ходе проведения дерепликации молекулярного состава наиболее активной фракции ГВ и восстановления их 2D-структур по SMILES было получено 156 уникальных структур (приведены в электронном приложении к статье), найденные как ингибиторы β -лактамаз по базе данных ChEMBL. Ранжирование найденных структур по липофильности, а также их эмпирическое сопоставление с данными о структурно-групповом и функционально-групповом составе основных строительных блоков ГВ, позволило отобрать две молекулы (лиганды 1 и 3), которым был приписан максимальный индекс подобия ГВ. Также в выборку была добавлена структура производного куркумина – бициклопентадиона (лиганд 2). Структуры и названия молекул по номенклатуре IUPAC показаны на рисунке 2. Они были использованы для дальнейшего моделирования.

Поскольку молекулярное моделирование проводили при pH 7, то лиганд 1 использовали в депротонированной форме. Для проверки адекватности используемой методики МД и выбранных структур гуминоподобных молекул проводили оценку поведения отобранных лигандов в изолированных системах. Для этого создавали систему из 125 копий лиганда, находящихся на расстоянии 25 Å друг от друга. Моделирование поведения лигандов проводили с использованием силового поля GAFF. Длина траектории молекулярной динамики для данных систем составляла 40 нс для каждой системы (рис. 3).

Склонность к агрегации выбранных гуминоподобных молекул хорошо согласуется с литературными данными по моделированию поведения гуминовых систем, для которых свойственно явление самоагрегации [27, 28]. Это связано с образованием межмолекулярных водородных связей с другими гуминоподобными молекулами, в явно заданных растворителях. Таким образом, полученные данные об агрегации выбранных гуминоподобных молекул косвенно указывают на корректность выбора исследуемых структур и правильность примененной в исследовании гуминоподобных молекул методики молекулярного моделирования в явно заданном растворителе с ненулевой ионной силой.

После выбора кристаллической структуры фермента было исследовано взаимодействие выбранных гуминоподобных лигандов с β -лактамазой TEM-1 со свободным активным сайтом. Для этого фермент помещали в периодический бокс размером 5×5×5 лигандов, находящихся на расстоянии 25 Å друг от друга, из центра которого извлекали 3×3×3 гуминоподобных лигандов, как показано на рисунке 4.

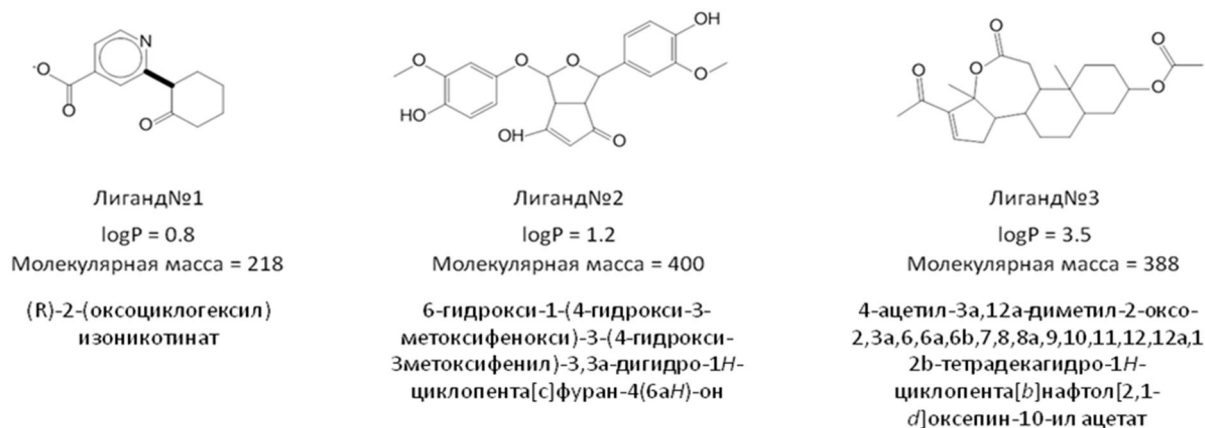


Рис. 2. Структуры «гуминоподобных» лигандов, выбранные для дальнейших исследований. Под структурами указаны логарифм липофильности, молекулярная масса, название по номенклатуре IUPAC

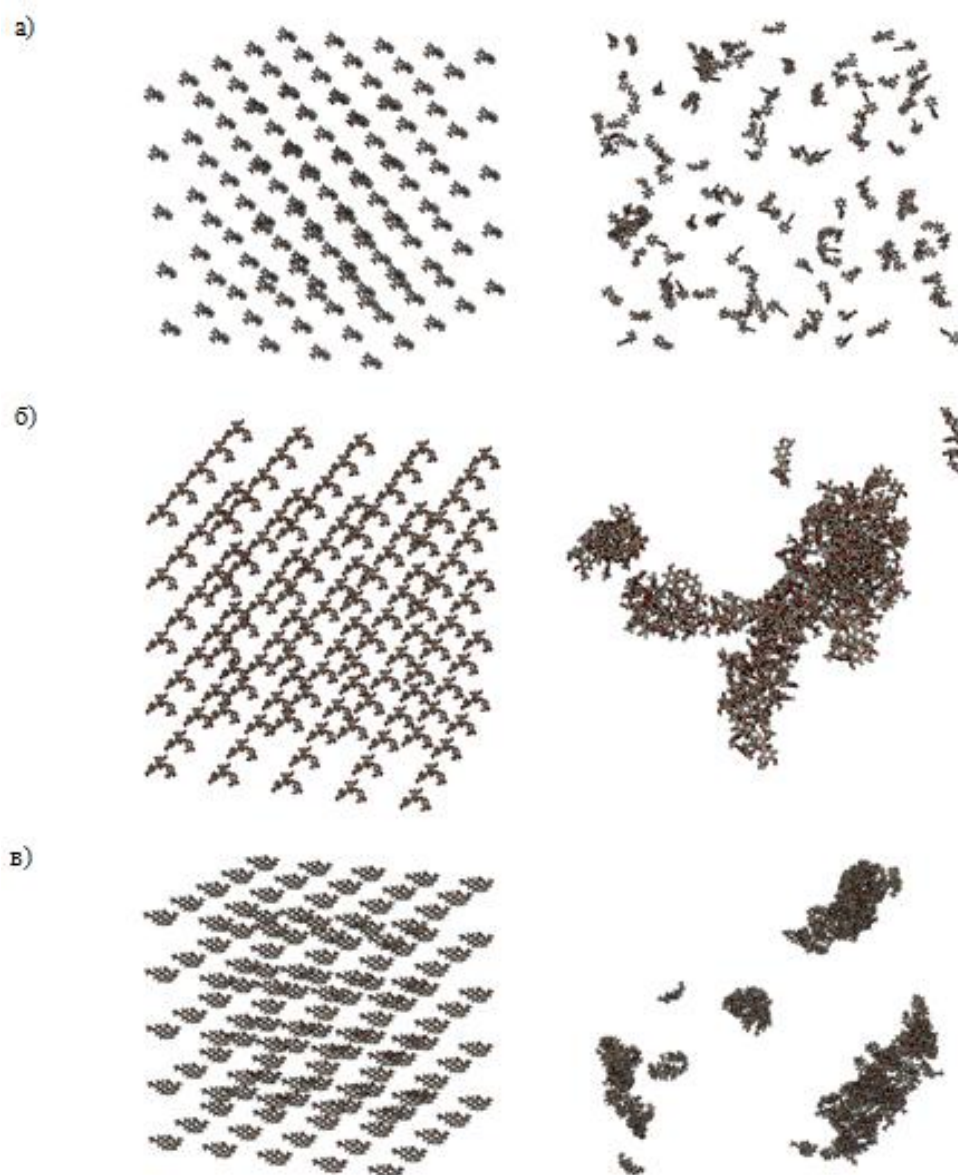


Рис. 3. Результаты молекулярного моделирования лиганда 1 (а), 2 (б), 3 (в). Начальное состояние системы (слева) и конечное состояние системы в конце молекулярной динамики (справа)

Для всех выбранных лигандов в ходе МД не наблюдалось взаимодействия с активным сайтом β -лактамазы. В то же время все лиганды взаимодействовали с поверхностью белка: так, лиганд 1 показал кинетически стабильное электростатическое нековалентное связывание в полостях белка, находящихся по бокам α -спирали Н9 рядом с остатками 201–208, а также кинетически устойчивое (более 30 нс) взаимодействие по аллостерическому сайту, описанному в литературе, который находится между α -спиралями Н10 и Н11 [29–32]. Воздействие на аллостерический сайт приводит к изменению подвижности и конформации белка. Для лигандов 2 и 3 наблюдалось образование агрегатов и их адсорбция на поверхности β -лактамазы (рис. 5).

При этом для лиганда 2 была характерна точечная адсорбция без изменения формы агрегатов на маленьких площадях поверхности белка, а для лиганда 3 – равномерное распределение на больших площадях поверхности β -лактамазы.

Тем самым, проведенный расчет показывает возможность взаимодействия гуминоподобных лигандов с β -лактамазой по обоим «неспецифическим механизмам», а именно связывание с аллостерическим сайтом и инкапсулирование β -лактамазы в составе агрегатов гуминоподобных молекул. Данные МД могут указывать на то, что при взаимодействии ГВ и β -лактамазы возможно проявление обоих механизмов ингибирования фермента.

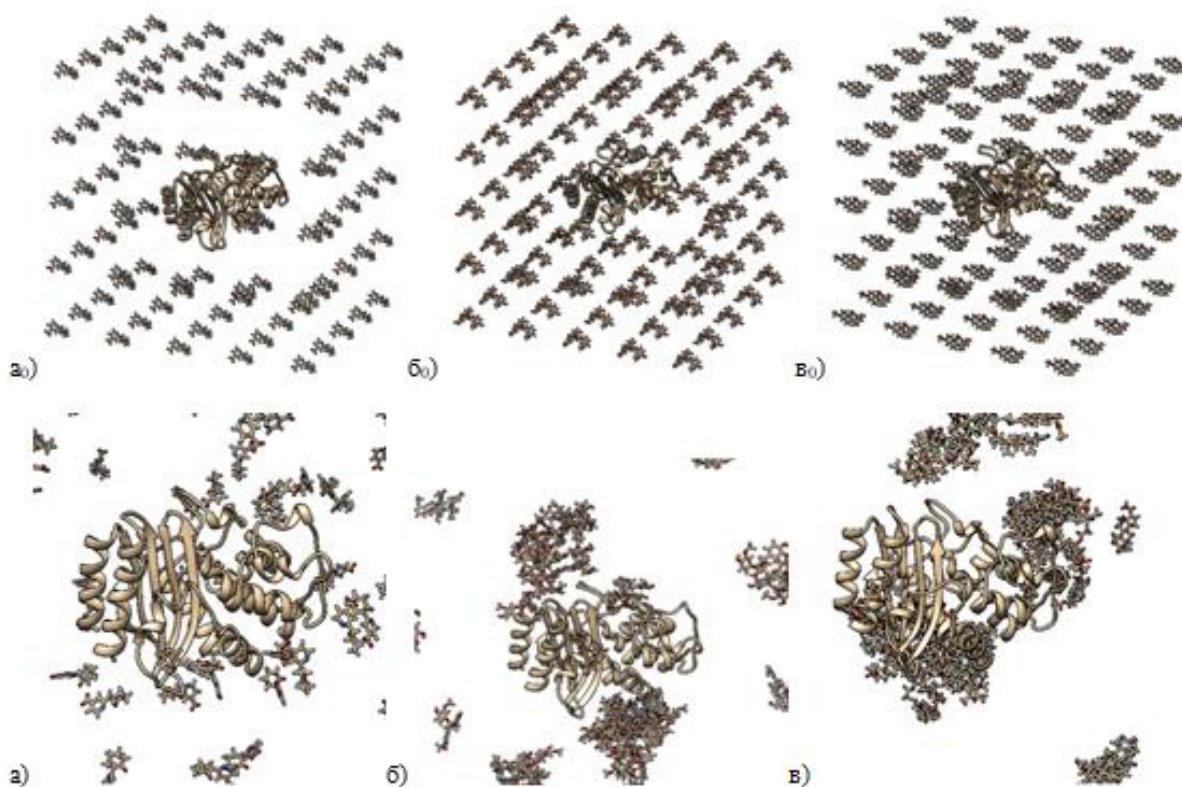


Рис. 4. Периодический бокс из 98 копий лиганда 1 (а₀), лиганда 2 (б₀), лиганда 3 (в₀). В центре бокса находится β-лактамаза TEM-1. Результаты молекулярной динамики лиганда 1 (а), лиганда 2 (б), лиганда 3 (в). На поверхности β-лактамазы TEM-1 сорбируются агрегаты лиганда 2 (б), лиганда 3 (в)

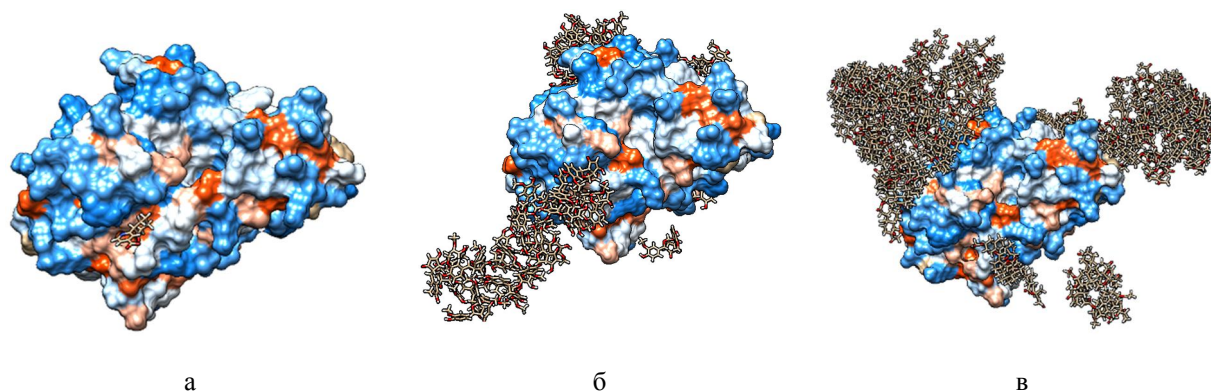


Рис. 5. Лиганд 1 (а) образует кинетически стабильные комплексы сериновой β-лактамазой (TEM-1). На рисунке изображена поверхность белка с лигандом 1 между спиралями N10 и N11. Лиганды 2 (б) и 3 (в) образуют низкомолекулярные агрегаты, сорбирующиеся на поверхности белка

На рисунке б_а показана среднеквадратичная флуктуация (RMSF) аминокислотных остатков, являющаяся характеристикой частоты движения аминокислот относительно среднего состояния во времени для комплексов всех трех гуминоподобных лигандов с бета-лактамазой. Сравнительный анализ влияния типа гуминоподобных молекул показал значительное увеличение подвижности остатков 211–220, находящихся на α-спирали N10, которая входит в аллостерический сайт фермента. При этом самое значительное влияние на подвижность спирали N10 оказывает лиганд 1: усредненная конформация белка в комплексе с лигандом 1 показана синим цветом на рисунке б_б.

Выполненные расчеты показывают, что гуминоподобные лиганды могут изменять конформацию бета-лактамазы TEM-1 за счет связывания с аллостерическим сайтом. Кроме того, наблюдаемое агрегирование гуминоподобных лигандов на поверхности белка также может вызывать конформационные изменения, модулирующие активность фермента.

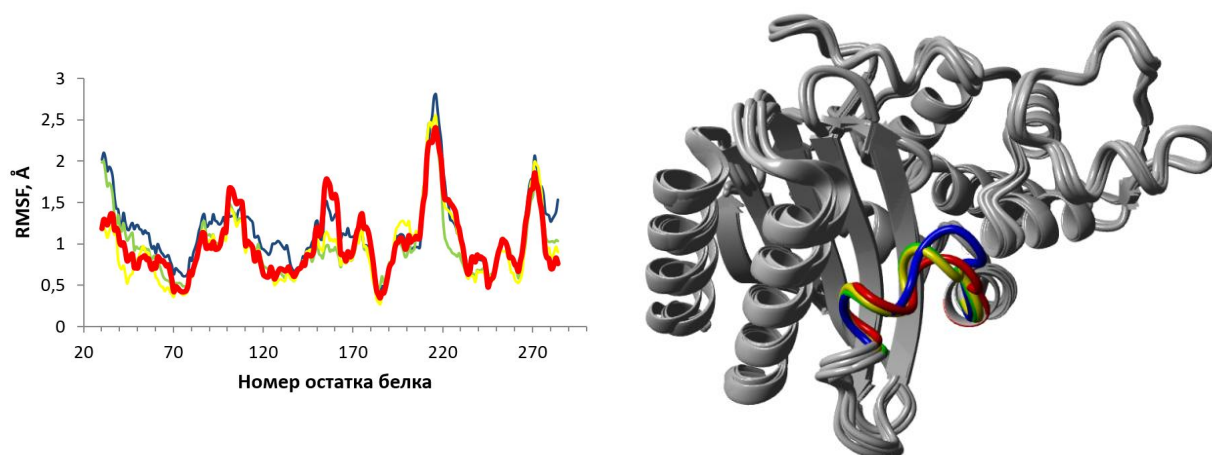


Рис. 6. (а) Среднеквадратичная флуктуация остатков β -лактамазы в системах с гуминоподобными лигандами 1 (синяя линия), 2 (желтая линия), 3 (зеленая линия). Жирная красная линия соответствует среднеквадратичной флуктуации остатков фермента в изолированной системе. Для сглаживания графиков среднеквадратичной флуктуации и девиации было использовано скользящее среднее с окном в 10 остатках. (б) Трехмерное изображение наложенных структур фермента. Серым обозначены остальные части белков, красным, зеленым и желтым отмечены остатки 212–222 соответственно: белка в изолированной системе, белка в системе с лигандом 2, белка в системе с лигандом 3. Остатки 212–222 белка в системе с лигандом 1 отмечены синим

Для моделирования синергетического действия ГВ на β -лактазные ингибиторы, которые проводили МД β -лактамазы в присутствии сульбактама в активном сайте в системе с лигандами 1, 2 и 3. Ключевым различием результатов МД по сравнению с системой без сульбактама является наличие неспецифических взаимодействий каждого из гуминоподобных лигандов с сульбактамом в активном сайте β -лактамазы, как показано на рисунке 7.

Так, для лиганда 1 характерно такое же поведение в отношении активного сайта, как и в отсутствие сульбактама. В то же время для лигандов 2 и 3 наблюдается взаимодействие с сульбактамом, которое приводит к блокированию активного сайта β -лактамазы, занятого сульбактамом. Данный тип взаимодействия может затруднять выход сульбактама из активного сайта и усиливать его ингибирующую активность. Этот механизм может лежать в основе наблюдаемого синергетического действия ГВ.

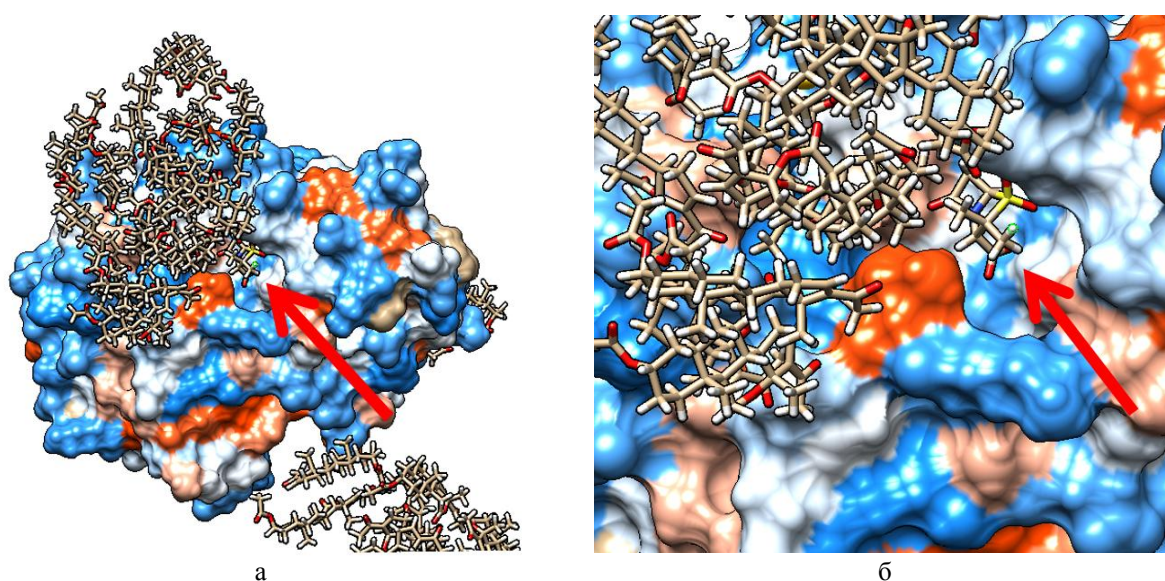


Рис. 7. Трехмерное изображение системы с β -лактамазой, сульбактамом (в активном сайте, указан красной стрелкой) и лигандом 3. На рисунке агрегаты из гуминоподобного лиганда 3 блокируют выход из активного сайта β -лактамазы

Заключение

В результате выполненных исследований впервые проведена молекулярная динамика взаимодействия гуминоподобных лигандов с белком бета-лактамазой TEM-1 в явно заданном растворителе (воде). Показана возможность образования супрамолекулярных агрегатов выбранными гуминоподобными лигандами, что хорошо согласуется с существующими литературными данными. Впервые показаны возможные типы взаимодействия гуминоподобных молекул с белком β -лактамазой TEM 1: гуминоподобные молекулы, которые не образуют агрегаты, могут связываться с известным аллостерическим сайтом между спиралями H10 и H11. Это указывает на неконкурентный характер взаимодействия гуминовых ингибиторов с активным сайтом белка. Кроме того, предложен механизм синергетического действия гуминовых веществ на сульбактам путем стерического блокирования сульбактама в активном сайте из-за неспецифической агрегации лигандов на поверхности белка.

Полученные данные показывают перспективность использования метода дерепликация для генерации гуминоподобных молекул и последующего выполнения молекулярной динамики и докинга активных компонентов ГВ.

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprtm.20240213955s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Благодарности

Авторы статьи выражают благодарность канд. хим. наук А.А. Орлову, канд. хим. наук М.Ю. Рубцовой и канд. физ.-мат. наук И.В. Упорову за неоценимый вклад в постановку выполненной работы и интерпретацию полученных результатов.

Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 20-63-47070.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Hamad B. The antibiotics market // Nature reviews Drug discovery. 2010. Vol. 9, no. 9. Pp. 675. DOI: 10.1038/nrd3267.
2. WHO. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. // World Health Organization website. <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>. Accessed. 2023. DOI: 10.1007/s12668-019-00658-4.
3. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance // Nature reviews microbiology. 2015. Vol. 13, no. 1. Pp. 42–51. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
4. Hall B.G., Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005. Vol. 55, no. 6. Pp. 1050–1051. DOI: 10.1093/jac/dki130.
5. Biondi S., Long S., Panunzio M., L. Qin W. Current trends in β -lactam based β -lactamases inhibitors // Current medicinal chemistry. 2011. Vol. 18, no. 27. Pp. 4223–4236. DOI: 10.2174/092986711797189655.
6. Docquier J.D., Mangani S. An update on β -lactamase inhibitor discovery and development // Drug Resistance Updates. 2018. Vol. 36. Pp. 13–29. DOI: 10.1016/j.drug.2017.11.002.
7. Strynadka N.C., Jensen S.E., Alzari P.M., James M.N. A potent new mode of β -lactamase inhibition revealed by the 1.7 Å X-ray crystallographic structure of the TEM-1–BLIP complex // Nature structural biology. 1996. Vol. 3, no. 3. Pp. 290–297. DOI: 10.1038/nsb0396-290.
8. Roccatano D., Sbardella G., Aschi M., Amicosante G., Bossa C., Nola A.D., Mazza F. Dynamical aspects of TEM-1 β -lactamase probed by molecular dynamics // Journal of computer-aided molecular design. 2005. Vol. 19. Pp. 329–340. DOI: 10.1007/s10822-005-7003-0.
9. Jelsch C., Mourey L., Masson J.M., Samama J.P. Crystal structure of Escherichia coli TEM1 β -lactamase at 1.8 Å resolution // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 1993. Vol. 16, no. 4. Pp. 364–383. DOI: 10.1002/prot.340160406.
10. Livermore D.M. Determinants of the activity of β -lactamase inhibitor combinations // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1993. Vol. 31. Pp. 9–21. DOI: 10.1093/jac/31.suppl_A.9.
11. Drawz S.M., Bonomo R.A. Three decades of β -lactamase inhibitors // Clinical microbiology reviews. 2010. Vol. 23, no. 1. Pp. 160-201. DOI: 10.1128/cmr.00037-09.

12. Orlov A.A., Zhrebker A., Eletskaia A.A., Chernikov V.S., Kozlovskaya L.I., Zhernov Y.V., Kostyukevich Y., Palyulin V.A., Nikolaev E.N., Osolodkin D.I., Perminova I.V. Examination of molecular space and feasible structures of bioactive components of humic substances by FTICR MS data mining in ChEMBL database // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. Pp. 12066. DOI: 10.1038/s41598-019-48000-y.
13. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science // *Advances in Agronomy*. 2002. Pp. 57–134. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
14. Kleinhempel D. Ein Beitrag zur Theorie des Huminstoffzustandes // *Archives of Agronomy and Soil Science*. 1970. Vol. 14, no. 1. Pp. 3–14. DOI: 10.1080/03650347009412655.
15. Mikhnevich T.A., Vyatkina A.V., Grigorenko V.G., Rubtsova M.Y., Rukhovich G.D., Letarova M.A., Kravtsova D.S., Vladimirov S.A., Orlov A.A., Nikolaev E.N., Zhrebker A. Inhibition of class A β -lactamase (TEM-1) by narrow fractions of humic substances // *ACS omega*. 2021. Vol. 6, no. 37. Pp. 23873–23883. DOI: 10.1021/acsomega.1c02841.
16. Zhernov Y.V., Kremb S., Helfer M., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Brack-Werner R., Schmitt-Kopplin P. Supramolecular combinations of humic polyanions as potent microbicides with polymodal anti-HIV-activities // *New Journal of Chemistry*. 2017. Vol. 41, no. 1. Pp. 212–224. DOI: 10.1039/C6NJ00960C.
17. Zhernov Y.V., Konstantinov A.I., Zhrebker A., Nikolaev E., Orlov A., Savinykh M.I., Kornilaeva G.V., Karamov E.V., Perminova I.V. Antiviral activity of natural humic substances and shilajit materials against HIV-1: Relation to structure // *Environmental Research*. 2021. Vol. 193. Pp. 110312. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110312.
18. Klöcking H.P. Influence of natural humic acids and synthetic phenolic polymers on haemostasis // *In Recent Developments in Toxicology: Trends, Methods and Problems: Proceedings of the European Societies of Toxicology Meeting Held in Leipzig*. 1991. Pp. 166–169. DOI: 10.1007/978-3-642-74936-0_33.
19. Zeck-Kapp G., Nauck M., Riede U.N., Block L., Freudenberg N., Seubert B. Low-molecular humic substances as pro-inflammatory cell signals // *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1991. Vol. 75. Pp. 504.
20. Neyts J., Snoeck R., Wutzler P., Cushman M., Klöcking R., Helbig B., Wang P., De Clercq E. Poly(hydroxy)carboxylates as selective inhibitors of cytomegalovirus and herpes simplex virus replication // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 1992. Vol. 3, no. 4. Pp. 215–222. DOI: 10.1177/095632029200300404.
21. Orlov A.A., Zhrebker A., Eletskaia A.A., Chernikov V.S., Kozlovskaya L.I., Zhernov Y.V., Kostyukevich Y., Palyulin V.A., Nikolaev E.N., Osolodkin D.I., Perminova I.V. Examination of molecular space and feasible structures of bioactive components of humic substances by FTICR MS data mining in ChEMBL database // *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. Pp. 12066. DOI: 10.1038/s41598-019-48000-y.
22. Mohimani H., Gurevich A., Shlemov A., Mikheenko A., Korobeynikov A., Cao L., Shcherbin E., Nothias L.F., Dorrestein P.C., Pevzner P.A. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra // *Nature communications*. 2018. Vol. 9, no. 1. Pp. 4035. DOI: 10.1038/s41467-018-06082-8.
23. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules // *Journal of the American Chemical Society*. 1995. Vol. 117, no. 19. Pp. 5179–5197. DOI: 10.1021/ja00124a002.
24. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB // *Journal of chemical theory and computation*. 2015. Vol. 11, no. 8. Pp. 3696–3713. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255
25. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis // *Journal of computational chemistry*. 2004. Vol. 25, no. 13. Pp. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
26. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. Development and testing of a general amber force field // *Journal of computational chemistry*. 2004. Vol. 25, no. 9. Pp. 1157–1174. DOI: 10.1002/jcc.20035.
27. Petrov D., Tunega D., Gerzabek M.H., Oostenbrink C. Molecular dynamics simulations of the standard leonardite humic acid: Microscopic analysis of the structure and dynamics // *Environmental Science & Technology*. 2017. Vol. 51, no. 10. Pp. 5414–5424. DOI: 10.1021/acs.est.7b00266.
28. Ai Y., Zhao C., Sun L., Wang X., Liang L. Coagulation mechanisms of humic acid in metal ions solution under different pH conditions: A molecular dynamics simulation // *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 702. Pp. 135072. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135072.
29. Bowman G.R., Geissler P.L. Equilibrium fluctuations of a single folded protein reveal a multitude of potential cryptic allosteric sites // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109, no. 29. Pp. 11681–11686. DOI: 10.1073/pnas.1209309109.
30. Avci F.G., Altinisik F.E., Vardar U.D., Ozkirimli O.E., Sariyar A.B. An evolutionarily conserved allosteric site modulates beta-lactamase activity // *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2016. Vol. 31, no. 3. Pp. 33–40. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.12.068.
31. Avci F.G., Altinisik F.E., Karacan I., Karagoz D.S., Ersahin S., Eren A., Sayar N.A., Ulu D.V., Ozkirimli E., Akbulut B.S. Targeting a hidden site on class A beta-lactamases // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2018. Vol. 84. Pp. 125–133. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.06.007.
32. Horn J.R., Shoichet B.K. Allosteric inhibition through core disruption // *Journal of molecular biology*. 2004. Vol. 336, no. 5. Pp. 1283–1291. DOI: 10.1080/14756366.2016.1201813.

Поступила в редакцию 9 ноября 2023 г.

Принята к публикации 14 мая 2024 г.

Vladimirov S.A.*, Rukhovich G.D., Radchenko E.V., Perminova I.V. DEVELOPMENT OF APPROACHES TO MOLECULAR MODELING OF THE INTERACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS OF HUMIC SUBSTANCES WITH BETA-LACTAMASES ON THE EXAMPLE OF HUMIC-LIKE LOW-MOLECULAR WEIGHT ANALOGUES

Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Faculty of Chemistry, 119991, Moscow, GSP-1, Leninskie Gory, 1, building 3, vladimirof.work@gmail.com

β -Lactamase inhibitors are used to protect betalactam antibiotics from the action of antibiotic resistant bacteria. However, due to the emergence of resistance to β -lactam inhibitors, the search for new non-betalactam inhibitors is an urgent task. In this work, natural humic substances (HS) are considered as a new source of beta-lactamase inhibitors. We previously reported on the ability of coal humic acids and their narrow fractions to inhibit TEM-1 β -lactamases. The purpose of this work was to study the mechanism of interaction between the molecular components of humic substances using molecular modeling. The selection of humic-like molecules was carried out using the dereplication method based on the known inhibitory activity of the HS fraction and its molecular composition as determined by high-resolution mass spectrometry. Modeling of the interaction of selected molecules with beta-lactamase protein was carried out using docking and molecular dynamics methods using Chimera v.1.15 software and Amber14. As a result of dereplication, 156 unique structures were identified, of which three were selected. The modeling results showed that the most likely mechanism of interaction of HS with beta-lactamase is non-competitive inhibition as a result of binding to the allosteric site of the protein. In addition, nonspecific aggregation on the protein surface is possible, which also explains the synergistic effect of HS with respect to sulbactam, which might be sterically blocked in the active site of betalactamase. The prospects of using the dereplication method for studying the molecular mechanisms of the biological activity of humic substances are shown.

Keywords: Beta-lactamase inhibitors, humic substances, molecular modeling, dereplication, docking, molecular dynamics.

For citing: Vladimirov S.A., Rukhovich G.D., Radchenko E.V., Perminova I.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 2, pp. 329–339. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240213955.

References

1. Hamad B. *Nature reviews Drug discovery*, 2010, vol. 9, no. 9, pp. 675. DOI: 10.1038/nrd3267.
2. WHO. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis. // World Health Organization website. <https://www.who.int/news-room/detail/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>. Accessed. 2023. DOI: 10.1007/s12668-019-00658-4.
3. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. *Nature reviews microbiology*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 42–51. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
4. Hall B.G., Barlow M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, vol. 55, no. 6, pp. 1050–1051. DOI: 10.1093/jac/dki130.
5. Biondi S., Long S., Panunzio M., L. Qin W. *Current medicinal chemistry*, 2011, vol. 18, no. 27, pp. 4223–4236. DOI: 10.2174/092986711797189655.
6. Docquier J.D., Mangani S. *Drug Resistance Updates*, 2018, vol. 36, pp. 13–29. DOI: 10.1016/j.drug.2017.11.002.
7. Strynadka N.C., Jensen S.E., Alzari P.M., James M.N. *Nature structural biology*, 1996, vol. 3, no. 3, pp. 290–297. DOI: 10.1038/nsb0396-290.
8. Roccatano D., Sbardella G., Aschi M., Amicosante G., Bossa C., Nola A.D., Mazza F. *Journal of computer-aided molecular design*, 2005, vol. 19, pp. 329–340. DOI: 10.1007/s10822-005-7003-0.
9. Jelsch C., Mourey L., Masson J.M., Samama J.P. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1993, vol. 16, no. 4, pp. 364–383. DOI: 10.1002/prot.340160406.
10. Livermore D.M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1993, vol. 31, pp. 9–21. DOI: 10.1093/jac/31.suppl_A.9.
11. Drawz S.M., Bonomo R.A. *Clinical microbiology reviews*, 2010, vol. 23, no. 1, pp. 160–201. DOI: 10.1128/cmr.00037-09.
12. Orlov A.A., Zhrebker A., Eletskaia A.A., Chernikov V.S., Kozlovskaya L.I., Zhernov Y.V., Kostyukovich Y., Palyulin V.A., Nikolaev E.N., Osolodkin D.I., Perminova I.V. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 12066. DOI: 10.1038/s41598-019-48000-y.
13. Piccolo A. *Advances in Agronomy*, 2002, pp. 57–134. DOI: 10.1016/S0065-2113(02)75003-7.
14. Kleinhempel D. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1970, vol. 14, no. 1, pp. 3–14. DOI: 10.1080/03650347009412655.
15. Mikhnevich T.A., Vyatkina A.V., Grigorenko V.G., Rubtsova M.Y., Rukhovich G.D., Letarova M.A., Kravtsova D.S., Vladimirov S.A., Orlov A.A., Nikolaev E.N., Zhrebker A. *ACS omega*, 2021, vol. 6, no. 37, pp. 23873–23883. DOI: 10.1021/acsomega.1c02841.
16. Zhernov Y.V., Kremb S., Helfer M., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Brack-Werner R., Schmitt-Kopplin P. *New Journal of Chemistry*, 2017, vol. 41, no. 1, pp. 212–224. DOI: 10.1039/C6NJ00960C.
17. Zhernov Y.V., Konstantinov A.I., Zhrebker A., Nikolaev E., Orlov A., Savinykh M.I., Kornilaeva G.V., Karamov E.V., Perminova I.V. *Environmental Research*, 2021, vol. 193, pp. 110312. DOI: 10.1016/j.envres.2020.110312.
18. Klöcking H.P. *In Recent Developments in Toxicology: Trends, Methods and Problems: Proceedings of the European Societies of Toxicology Meeting Held in Leipzig*. 1991, pp. 166–169. DOI: 10.1007/978-3-642-74936-0_33.
19. Zeck-Kapp G., Nauck M., Riede U.N., Block L., Freudenberg N., Seubert B. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 1991, vol. 75, pp. 504.

* Corresponding author.

20. Neyts J., Snoeck R., Wutzler P., Cushman M., Klöcking R., Helbig B., Wang P., De Clercq E. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 1992, vol. 3, no. 4, pp. 215–222. DOI: 10.1177/095632029200300404.
21. Orlov A.A., Zhrebker A., Eletskaia A.A., Chernikov V.S., Kozlovskaya L.I., Zhernov Y.V., Kostyukevich Y., Palyulin V.A., Nikolaev E.N., Osolodkin D.I., Perminova I.V. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 12066. DOI: 10.1038/s41598-019-48000-y.
22. Mohimani H., Gurevich A., Shlemov A., Mikheenko A., Korobeynikov A., Cao L., Shcherbin E., Nothias L.F., Dorrestein P.C., Pevzner P.A. *Nature communications*, 2018, vol. 9, no. 1, pp. 4035. DOI: 10.1038/s41467-018-06082-8.
23. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. *Journal of the American Chemical Society*, 1995, vol. 117, no. 19, pp. 5179–5197. DOI: 10.1021/ja00124a002.
24. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. *Journal of chemical theory and computation*, 2015, vol. 11, no. 8, pp. 3696–3713. DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00255
25. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. *Journal of computational chemistry*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612. DOI: 10.1002/jcc.20084.
26. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. *Journal of computational chemistry*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1157–1174. DOI: 10.1002/jcc.20035.
27. Petrov D., Tunega D., Gerzabek M.H., Oostenbrink C. *Environmental Science & Technology*, 2017, vol. 51, no. 10, pp. 5414–5424. DOI: 10.1021/acs.est.7b00266.
28. Ai Y., Zhao C., Sun L., Wang X., Liang L. *Science of the Total Environment*, 2020, vol. 702, pp. 135072. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135072.
29. Bowman G.R., Geissler P.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, vol. 109, no. 29, pp. 11681–11686. DOI: 10.1073/pnas.1209309109.
30. Avci F.G., Altinisik F.E., Vardar U.D., Ozkirimli O.E., Sariyar A.B. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2016, vol. 31, no. 3, pp. 33–40. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.12.068.
31. Avci F.G., Altinisik F.E., Karacan I., Karagoz D.S., Ersahin S., Eren A., Sayar N.A., Ulu D.V., Ozkirimli E., Akbulut B.S. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2018, vol. 84, pp. 125–133. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.06.007.
32. Horn J.R., Shoichet B.K. *Journal of molecular biology*, 2004, vol. 336, no. 5, pp. 1283–1291. DOI: 10.1080/14756366.2016.1201813.

Received November 9, 2023

Revised May 14, 2024

Сведения об авторах

Владимиров Сергей Алимович – младший научный сотрудник, vladimirof.work@gmail.com

Рухевич Глеб Дмитриевич – студент, rukhovich@gmail.com

Радченко Евгений Валерьевич – кандидат химических наук, доцент, genie@qsar.chem.msu.ru

Перминова Ирина Васильевна – главный научный сотрудник, доктор химических наук, профессор, ipermnova@gmail.com

Information about authors

Vladimirov Sergey Alimovich – junior researcher, vladimirof.work@gmail.com

Rukhevich Gleb Dmitrievich – student, rukhovich@gmail.com

Radchenko Evgeniy Valerievich – PhD in Chemistry, associate professor, genie@qsar.chem.msu.ru

Perminova Irina Vasilievna – Chief Researcher, Doctor of Chemical Sciences, Professor, ipermnova@gmail.com