

УДК 577.151.4, 577.322.24

ИЗУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ БЕТА-ЛАКТАМАЗ ТЕМ-ТИПА С СУБСТРАТАМИ И ИНГИБИТОРАМИ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

И.В. Упоров, В.Г. Григоренко, М.Ю. Рубцова*, А.М. Егоров

(кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

Методами молекулярной динамики проведено моделирование комплексообразования бета-лактамазы TEM-1 и трех ее мутантных форм TEM-32, TEM-37, TEM-39 с субстратами цефалотин, CENTA и ингибиторами сериновых бета-лактамаз сульбактамом, тазобактамом и клавулановой кислотой. Установлено, что стабильность комплексов обусловлена электростатическим притяжением между депротонированной карбоксильной группой бета-лактамного кольца субстрата (ингибитора) и положительно заряженными аминогруппами лизинов 234 и 73, расположенных в активном центре ферментов. Для некоторых комплексов установлено образование водородной связи между указанной группой субстрата или его карбонильным кислородом с гидроксильной группой каталитического серина 70, а также между отрицательно заряженными группами заместителей и областью положительного заряда, сформированной гуанидиновой группой аргинина 244 и аминогруппой аспарагина 276. Показано, что энергия связывания субстрата CENTA с бета-лактамазой TEM-1 ниже аналогичной энергии связывания цефалотина, что было подтверждено экспериментально определенными значениями констант Михаэлиса. Также установлено, что ингибиторы связываются с мутантными формами бета-лактамаз, относящимися к ингибитор-устойчивому фенотипу, с большей аффинностью по сравнению с бета-лактамазой TEM-1.

Ключевые слова: молекулярная динамика, бета-лактамазы TEM-типа, CENTA, цефалотин, сульбактам, тазобактам, клавулановая кислота, антибиотикорезистентность.

Продукция бактериальных ферментов бета-лактамаз обеспечивает устойчивость возбудителей инфекционных заболеваний к бета-лактамам антибиотикам [1–3]. К настоящему времени описаны более 2000 вариантов бета-лактамаз [4]. Данный тип устойчивости, будучи самым распространенным во многих географических регионах мира, представляет собой глобальную угрозу [1, 5, 6]. По механизму каталитического действия бета-лактамазы относятся к гидролазам. По строению активного центра они делятся на серинсодержащие гидролазы и металлоферменты, имеющие один или два атома цинка. Гидролиз бета-лактамовых антибиотиков включает две последовательные стадии ацилирования-деацилирования с образованием тетраэдрического интермедиата. У сериновых бета-лактамаз в стадии ацилирования участвует гидроксильная группа серина 70, формирующая одну из связей промежуточного комплекса, в центре которого располагается карбонильный углерод бета-лактамного кольца. В последующей стадии деацилирования происходит разрыв связи между карбонильным углеродом и азотом бета-лактамного кольца с участием остатка глутамата

166 и молекулы воды, связанной в активном центре фермента [3].

Чрезвычайно высокая распространенность устойчивых к бета-лактамам антибиотикам бактерий делает актуальным как изучение молекулярных механизмов функционирования данных ферментов, так и поиск эффективных ингибиторов для преодоления резистентности. В клинической практике для инактивации сериновых бета-лактамаз молекулярного класса А активно используют комбинации пенициллинов и цефалоспоринов с ингибиторами (клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом). По строению данные ингибиторы аналогичны бета-лактамам и имеют в своей структуре бета-лактамное кольцо [3].

Поиск новых, более эффективных ингибиторов может быть основан на подборе соединений, образующих стабильные ковалентные комплексы с ферментом. Для этого необходимо подробно изучить механизмы связывания субстратов и ингибиторов бета-лактаманной природы в активном центре фермента. Представляет также интерес изучение связывания субстратов и ингибиторов с мутантными формами бета-лактамаз, имеющими

устойчивость к ингибиторам. Проведение теоретического моделирования процесса связывания и гидролиза современными методами квантовой химии затруднительно по причине отсутствия детальной информации о пространственной структуре комплексов активного центра бета-лактамаз с субстратом непосредственно перед стадией ацилирования. Методы квантовой химии чрезвычайно чувствительны к пространственному расположению атомов квантовой системы. Отклонение межатомных расстояний на 0,1 Å или валентных углов на несколько градусов приводит к изменению высоты вычисляемых энергетических барьеров до 5 ккал/моль, что соответствует четырем порядкам в значении каталитической константы. Структуру преацильного комплекса не удается получить экспериментальными методами, поскольку даже в кристаллическом состоянии молекулы фермента остаются достаточно активными и способными гидролизовать субстрат. В банке данных белковых структур имеются пространственные структуры бета-лактамаз, ковалентно связанных с суицидными ингибиторами, а также ферментов с мутированными остатками активного центра, не способных к гидролизу природных субстратов.

Цель данной работы – изучение комплексообразования субстратов и ингибиторов бета-лактаманной структуры с активным центром бета-лактамаз TEM-типа методом молекулярной динамики. В качестве модельных ферментов были использованы четыре сериновые бета-лактамазы, относящиеся к TEM-типу: бета-лактамаза дикого типа TEM-1 и три ее мутантные формы TEM-32, TEM-37 и TEM-39, характеризующиеся устойчивостью к ингибиторам. В качестве субстратов были исследованы антибиотик цефалотин (цефалоспорин I поколения) и хромогенный субстрат CENTA, представляющий собой производное цефалотина [7]. Выбор для изучения субстрата CENTA объясняется тем, что он, в отличие от цефалоспоринов, способен эффективно связываться с бета-лактамазами, различающимися по субстратной специфичности в отношении пенициллинов и цефалоспоринов [7]. В качестве ингибиторов были исследованы сульбактам, тазобактам и клавулановая кислота. Химические структуры субстратов и ингибиторов приведены на рис. 1.

Экспериментальная часть

Вычислительные методы. Пространственные структуры молекул субстратов и ингибиторов были построены с помощью программы ChemBio3D компании «CambridgeSoft» [8]. Гидроксильные группы были депротонированы, что обеспечило всем

молекулам заряд $-1e$, кроме молекулы CENTA, заряд которой составил $-2e$. Пространственные структуры молекул были оптимизированы методом полуэмпирической квантовой химии PM6 [9] с помощью программы MOPAC [10]. Параметризацию молекул проводили с использованием сервиса «SwissParam» [11] в соответствии с силовым полем CHARMM27 [12].

В качестве структур бета-лактамаз TEM-1 и TEM-32 были использованы структуры из банка данных PDB с кодами доступа 1BTL и 1LI0 соответственно [13, 14]. В обеих структурах молекулы связанной воды и ионов были опущены из рассмотрения. Пространственные структуры бета-лактамаз TEM-37 и TEM-39 были получены из структуры бета-лактамазы TEM-32 путем мутаций соответствующих аминокислот. Для каждой из систем фермент–субстрат (ингибитор) изучаемая молекула была помещена в активный центр фермента с соблюдением ориентации, благоприятной для стадий ацилирования и деацилирования. Далее проводили моделирование динамики при постоянной температуре системы до достижения равновесного состояния субстрата и окружающих атомов белка. Для удержания субстрата вблизи фермента комплекс фермент–субстрат помещали в сферу, заполненную молекулами воды, которые полностью покрывали весь белок. Центр сферы был расположен в геометрическом центре молекулы белка. Для нейтрализации заряда системы были добавлены противоионы. Полученная капля подвергалась процедуре минимизации потенциальной энергии (1000 шагов) с последующей молекулярной динамикой на протяжении двух наносекунд. Конформации системы сохранялись каждые две пикосекунды. Подготовка пространственных структур белков для молекулярной динамики, докинг субстратов в активный центр, сольватирование и нейтрализация заряда системы, энергетическая минимизация и молекулярная динамика, визуальный анализ полученных траекторий, вычисление энергии взаимодействия фермента с субстратом выполнялись с помощью пакета программ VMD/NAMD, разработанного в Бекмановском институте Университета Иллинойса в Урбана–Шампэйн [15, 16].

Получение рекомбинатных штаммов, выделение и очистка препаратов бета-лактамаз проводили по методике, детально описанной нами ранее [17]. Периплазматическую фракцию бактерий *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидным вектором *pET-bla* с геном, кодирующим соответствующую бета-лактамазу, выделяли методом осмотического шока, далее фермент вы-

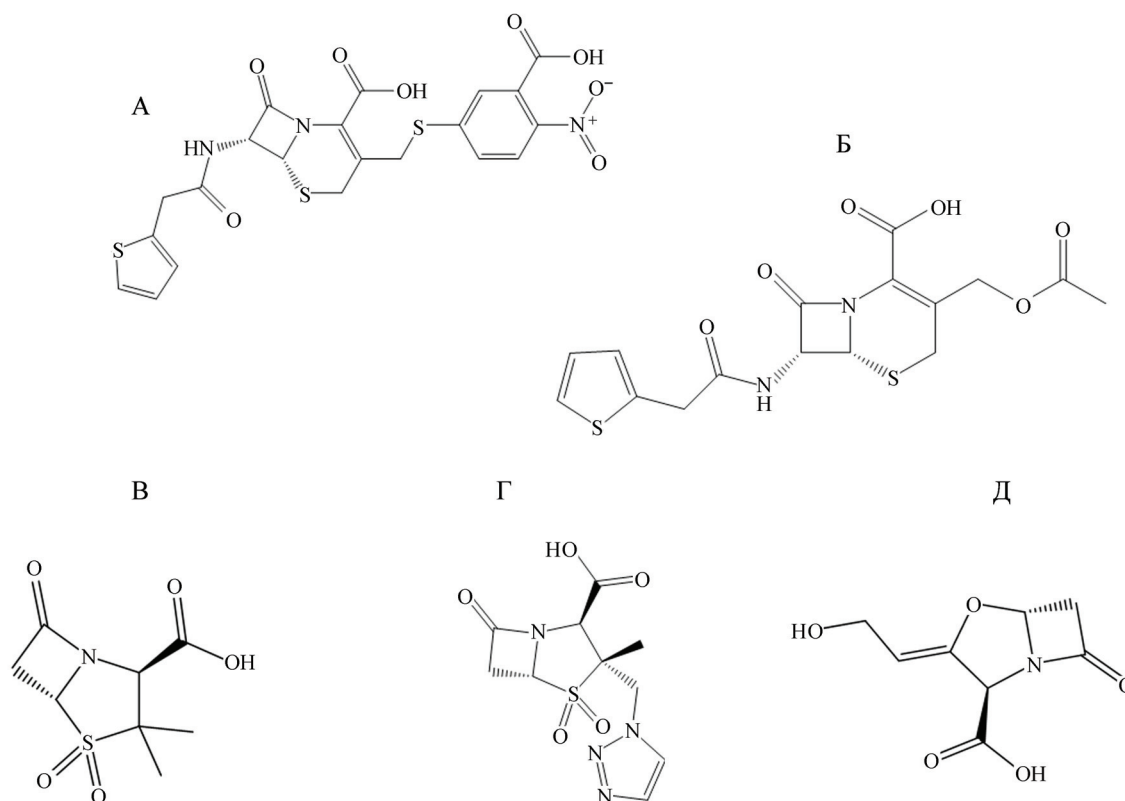


Рис. 1. Структуры субстратов: СЕНТА (А), цефалотин (Б); структуры ингибиторов: сульбактам (В), тазобактам (Г), клавулановая кислота (Д)

деляли анионообменной хроматографией и гель-фильтрацией.

Результаты и обсуждение

В работе было изучено комплексообразование субстратов и ингибиторов с четырьмя вариантами бета-лактамаз ТЕМ-типа. Фермент ТЕМ-1 является родоначальником семейства бета-лактамаз ТЕМ-типа, остальные ферменты являются его мутантными формами: ТЕМ-32 имеет две мутации (M69I и M182T), ТЕМ-37 – две мутации (V69I и N276D), ТЕМ-39 – три мутации (M69L, W165R и R275D). Остатки метионина 69 и триптофана 165 непосредственно примыкают к области связывания субстрата, остатки аргинина 275 и аспарагина 276 контактируют с бета-листом, ограничивающим центр связывания, остаток метионина 182 находится на значительном удалении от каталитического серина.

Для изучения структур комплексов использовали подход молекулярной динамики, предложенный для изучения взаимодействия белков с органическими соединениями. Сначала исследуемую

молекулу помещали в полость активного центра фермента в ориентации взаимного сближения боковой цепи каталитического серина 70 и карбонильной группы бета-лактаманного кольца субстрата, благоприятной для образования интермедиата. Для деацилирования карбонильная группа бета-лактаманного кольца должна была располагаться недалеко от остатка глутамата 166. Таким образом, ориентацию субстрата осуществляли так, чтобы его атомы не перекрывались с атомами белка, и карбонильная группа бета-лактаманного кольца находилась в пространстве между двумя указанными остатками. Как правило, выбранная конформация являлась напряженной, характеризующейся высокой энергией взаимодействия. Проведение последующей динамики при постоянной температуре приводило субстрат и окружающие атомы белка в равновесное состояние за время моделирования порядка сотен пикосекунд. Для удержания субстрата вблизи фермента их комплекс помещали в каплю воды, центр которой был расположен в геометрическом центре молекулы белка. Если в процессе моделирования молекула воды (или ион) вы-

ходила за пределы сферы (покидала каплю), то на нее накладывалась внешняя сила, направленная к центру сферы. Под действием этой силы молекула растворителя возвращалась в каплю. Внешняя сила обнулялась при пересечении молекулой растворителя границы капли, что позволило избежать дополнительного давления в системе, вызванного внешней силой.

Расчет энергии взаимодействия фермент–субстрат. Были получены траектории молекулярной динамики для всех изучаемых пар фермент–субстрат/ингибитор. Они были проанализированы для расчета энергии взаимодействия полученных комплексов. Для каждой сохраненной конформации в траектории была вычислена величина энергии несвязанных взаимодействий (электростатическое и вандерваальсово взаимодействия) между субстратом и ферментом. Заключительную часть траектории выбирали, исходя из предположения, что она отвечает равновесному положению субстрата в активном центре, которое соответствует связанному состоянию двух молекул. Несмотря на то, что в начале траектории в процессе докинга субстрат был «вдвинут» достаточно глубоко в активный центр белка, за время моделирования порядка 100 пс практически для всех комплексов было достигнуто взаимное расположение с менее интенсивным взаимодействием, которое оставалось стабильным при дальнейшем моделировании.

Для комплекса сульбактама с бета-лактамазой наблюдалась иная зависимость. В начальной конформации энергия взаимодействия сульбактама со всеми белками была примерно одинаковой. С течением времени взаимодействие ослабевало для комплекса сульбактама с бета-лактамазой TEM-39, в то время как для комплексов с

ферментами TEM-1, TEM-32 и TEM-37 тенденции на увеличение или уменьшение не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что комплекс сульбактама с бета-лактамазой TEM-39 разрушился за время проведения симуляции (2 нс).

Для остальных исследованных нами систем комплексы оставались связанными, что подтверждалось видом зависимости энергии взаимодействия от времени симуляции – флуктуации вокруг некоего среднего значения. Статистический анализ этих энергий показал, что средние значения энергии взаимодействия фермента с субстратом, вычисленные по последним 800 конформациям динамической траектории, достоверно различаются для каждого комплекса субстратов/ингибиторов с одним из четырех ферментов. Эти значения приведены в табл. 1.

На основании вычисленных значений полной энергии и статистической суммы для каждого комплекса фермента с субстратом (ингибитором) было рассчитано термодинамическое среднее значение энергии взаимодействия (табл. 2).

Сравнение средних значений энергии связывания цефалотина и СЕНТА с бета-лактамазой TEM-1 показывает, что последний связывается более эффективно. Этот результат согласуется с экспериментально определенными значениями константы Михаэлиса (K_M) гидролиза субстрата СЕНТА и литературными данными по значениям K_M цефалотина (табл. 3). Для всех исследованных бета-лактамаз с разной субстратной специфичностью субстрат СЕНТА характеризовался существенно более низкими значениями K_M .

Значения термодинамически усредненных энергий взаимодействия для этих субстратов сравнимы. Эти значения вычисляли, исходя из предположения, что система фермент–субстрат находится в

Таблица 1

Средние значения энергии взаимодействия комплексов фермента с субстратом (ингибитором), вычисленные по последним 800 конформациям динамической траектории

Средняя энергия взаимодействия (ккал/моль)	Бета-лактамаза			
	TEM-1	TEM-32	TEM-37	TEM-39
СЕНТА	–186,4	–175,4	–152,3	–207,9
Цефалотин	–177,7	–223,5	–168,4	–206,9
Сульбактам	–111,3	–158,9	–151,4	–50,8
Тазобактам	–144,9	–201,0	–166,8	–123,2
Клавулановая кислота	–178,1	–142,0	–151,2	–168,6

Т а б л и ц а 2

Термодинамические усредненные значения энергии взаимодействия фермента с субстратом (ингибитором), вычисленные по последним 800 конформациям динамической траектории

Усредненная энергия взаимодействия (ккал/моль)	Бета-лактамаза			
	ТЕМ-1	ТЕМ-32	ТЕМ-37	ТЕМ-39
СЕНТА	-184,5	-176,8	-186,6	-212,0
Цефалотин	-186,4	-232,2	-151,0	-195,2
Сульбактам	-102,2	-143,6	-153,6	-65,6
Тазобактам	-141,4	-173,1	-171,3	-171,2
Клавулановая кислота	-175,3	-148,1	-144,5	-172,1

Т а б л и ц а 3

Субстратная специфичность и значения констант Михаэлиса рекомбинантных бета-лактамаз в отношении субстратов СЕНТА и цефалотин

Бета-лактамаза	Субстратная специфичность	Мутации в сравнении с ферментом дикого типа (ТЕМ-1)	K_M , μM (СЕНТА)	K_M , μM (цефалотин)
ТЕМ-1	Пенициллины	–	29 \pm 3	250 [18]
ТЕМ-2	Пенициллины	Q39K	26 \pm 3	350 [19]
ТЕМ-12	Пенициллины и цефалоспорины	R164S	46 \pm 4	327 [20]
ТЕМ-18	Пенициллины и цефалоспорины	Q39K+ E104K	6 \pm 1	135 [21]
ТЕМ-7	Пенициллины и цефалоспорины	Q39K+ R164S	28 \pm 3	300 [22]

термодинамическом равновесии с растворителем. Совпадение соответствующих значений из табл. 1 и 2 следует ожидать в том случае, если в процессе моделирования динамики системы было накоплено достаточно много конформаций, адекватно представляющих термодинамически равновесное состояние системы фермент–субстрат–растворитель. Длина полученных траекторий (2 нс), вероятно, не полностью удовлетворяет последнему требованию, чем объясняются различия представленных в таблицах данных. Средние и усредненные значения энергий взаимодействия не совпадают, однако они отражают одинаковую тенденцию в изменении афинности субстратов к ферменту. СЕНТА более интенсивно связывается с бета-лактамазами ТЕМ-1 и ТЕМ-39 по сравнению с ферментами ТЕМ-32, ТЕМ-37. Цефалотин демонстрирует уменьшение интенсивности связыва-

ния с ферментами в следующем порядке ТЕМ-32, ТЕМ-39, ТЕМ-1 и ТЕМ-37.

Изменения энергии взаимодействия субстратов с активным центром фермента связаны с наличием мутаций в бета-лактамазах. Мутации остатков 165, 275, 276 приводят к изменению зарядового состояния белка, что отражается на связывании заряженных субстратов. Изменение расположения заряженных групп на поверхности белка приводит к изменению распределения молекул воды, сольватирующих белок, что также может влиять на образование комплекса фермента с субстратом.

Анализ полученных данных по связыванию ингибиторов показывает, что сульбактам связывается более интенсивно с бета-лактамазами ТЕМ-32 и ТЕМ-37, чем с ферментом ТЕМ-1. Аналогичную предпочтительность демонстрирует тазобактам: комплексообразование с бета-лактамазами

ТЕМ-32, ТЕМ-37 и ТЕМ-39 более эффективное по сравнению с бета-лактамазой ТЕМ-1. Клавуланат связывается интенсивнее с ТЕМ-1 и ТЕМ-39, чем с ТЕМ-32 и ТЕМ-37. Из вышесказанного следует, что ферменты, демонстрирующие ингибитор-резистентный фенотип, демонстрируют более интенсивное связывание с классическими ингибиторами бета-лактамаз, чем бета-лактамаза ТЕМ-1. В результате мутантные формы бета-лактамаз образуют с этими ингибиторами более стабильные, долгоживущие комплексы.

Сравнение энергий взаимодействия каждого из ферментов с пятью рассмотренными соединениями показывает, что чем длиннее заместители в соответствующих положениях бета-лактаманного кольца, тем более интенсивно они связываются с каждым из ферментов. Этот факт можно объяснить тем, что атомы более протяженных субстратов взаимодействуют не только с остатками активного центра белка, но и остатками, окаймляющими этот центр.

Анализ структуры комплексов фермента и субстрата (ингибитора). Визуальный анализ динамики изученных систем показал, что после начальной стадии комплексообразования во всех изученных парах фермент/эффе́ктор (кроме комплексов бета-лактамазы ТЕМ-39 с сульбактамом) молекулы приходят в равновесное положение (конформация субстрата и его ориентация относительно активного центра фермента), которое сохраняется в течение оставшегося времени моделирования. Наблюдаемые тепловые флуктуации в структуре комплекса представляют собой небольшие конформационные изменения положений боковых цепей остатков аминокислот и заместителей бета-лактаманного кольца субстрата.

Структуры комплексов бета-лактамазы ТЕМ-1 с субстратами СЕНТА и цефалотин представлены на рис. 2. СЕНТА связывается в положении, благоприятном для ацилирования. Карбонильный кислород субстрата расположен вблизи гидроксильной группы серина 70. Субстрат удерживается в активном центре за счет притяжения между депротонированной карбоксильной группой и протонированной аминогруппой лизина 234, а также заряженной боковой цепью аргинина 244. Карбоксильная и нитрогруппы бензольного кольца взаимодействуют с аминогруппой аспарагина 276. Перечисленные кулоновские взаимодействия надежно удерживают субстрат на входе в активный центр фермента. Связанная с бензольным кольцом нитрогруппа экспонирована в растворитель и сольватирована молекулами воды, что дополнительно стабилизирует комплекс. Заместитель, про-

тивоположный бензольному кольцу, экспонирован в растворитель своей пептидной группой, принявшей *cis*-конформацию.

Гидрофобная часть пятичленного кольца скрыта от воды боковой цепью аспарагина 170. Если бы субстрат сдвинулся вправо и вглубь из положения, представленного на рис. 2, это бы уменьшило расстояние между карбоксильной группой серина и карбонильным кислородом субстрата, а такое расположение более соответствует преацильному комплексу. Однако при этом пятичленное кольцо вплотную приблизилось бы к лейцину 169 внутри белковой глобулы и выигрыш в гидрофобной энергии не смог бы компенсировать проигрыш в электростатическом взаимодействии, описанном выше. Электростатическое взаимодействие заряженных заместителей бензольного кольца объясняет наблюдаемую разницу в интенсивности связывания этого субстрата с ферментами ТЕМ-37 и ТЕМ-39 по сравнению с ТЕМ-1. У бета-лактамазы ТЕМ-39 аргинин 275 заменен на аспарат. Это приводит к расталкиванию боковых цепей остатков 275 и 276, в результате чего усиливается притяжение между заряженными заместителями на бензольном кольце и аминогруппой аспарагина 276. У фермента ТЕМ-37 аспарагин 276 заменен на аспарат, и описанное выше притяжение заменяется отталкиванием, что способствует увеличению энергии взаимодействия в комплексе.

Наиболее важное отличие связывания субстратов СЕНТА и цефалотина состоит в том, что карбонильный кислород цефалотина находится на большем расстоянии от карбоксильной группы серина 70, чем аналогичный атом СЕНТА. Карбоксильная группа субстрата также отодвинута от аминогруппы лизина 234 на большее расстояние, чем у субстрата СЕНТА. Субстрат фиксируется в активном центре за счет следующих взаимодействий: карбонильный кислород лактамного кольца с лизином 73, водородная связь NH-группы боковой цепи заместителя с серином 70 и глутаминовой кислотой 166, карбонильный кислород заместителя с аминогруппой аспарагина 276 и аргинином 244. Последние из перечисленных взаимодействий приводят к тому, что субстрат оказывается «неодвинут» внутрь белковой глобулы и его пятичленное кольцо экспонировано в растворитель. Кроме того, метильная группа на конце одного из заместителей также экспонирована в растворитель. Проигрыш в сольватации компенсируется кулоновским взаимодействием с аспарагином 276 и аргинином 244. Полученная структура комплекса объясняет различия афинности цефалотина к ферментам ТЕМ-37 и ТЕМ-39 по сравнению с ТЕМ-1,

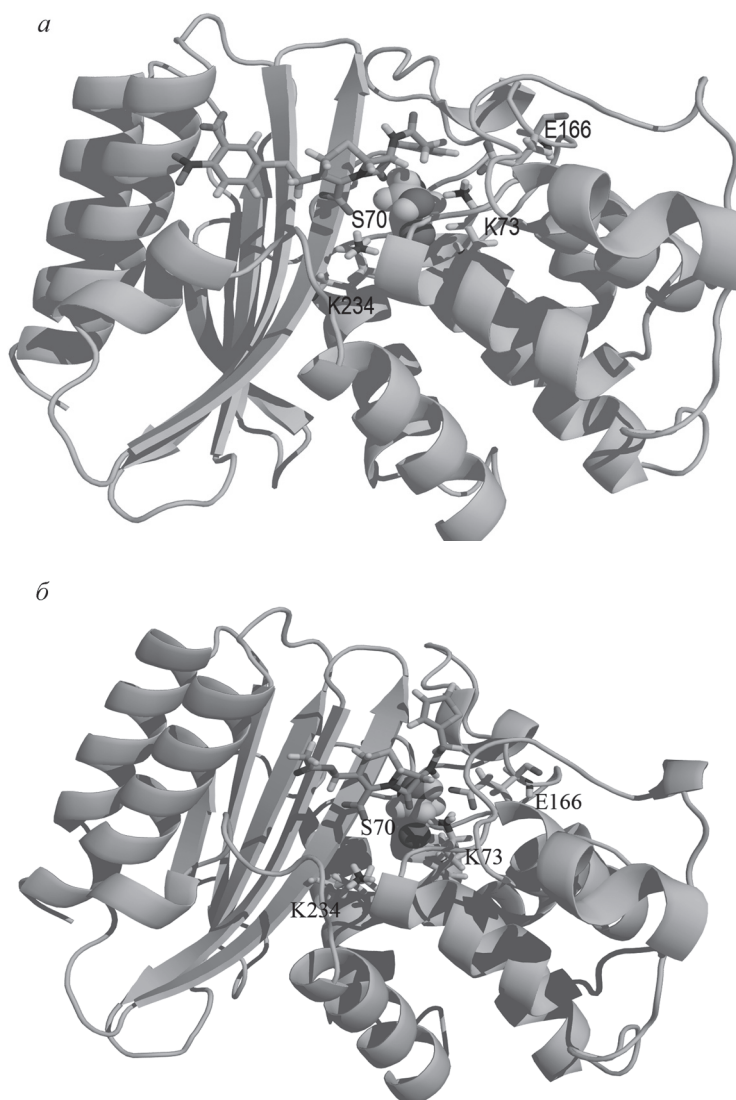


Рис. 2. Структура комплексов бета-лактамазы TEM-1 с субстратами СЕНТА (*а*) и цефалотин (*б*). Остаток каталитического серина изображен в шаровом представлении, остатки каталитического центра и субстрат – в стержневом

а также коррелирует с существенно меньшей константой Михаэлиса для СЕНТА, чем для цефалотина, полученными экспериментально.

Структуры комплексов бета-лактамазы TEM-1 с тремя типами ингибиторов представлены на рис. 3. Связывание сульбактама демонстрирует наибольшее различие в энергии связывания с бета-лактамазами TEM-1 и TEM-37. В силу меньшего продольного размера сульбактама по сравнению как с СЕНТА, так и с цефалотином, он имеет большую свободу в активном центре фермента. Его связывание в активном центре фермента обеспечивается притяжением между карбоксильным кислородом ингибитора и заряженной боковой цепью лизина 234. Возможно также образование водородной связи между кислородом

карбоксильной группы ингибитора и гидроксильной группой каталитического серина 70. Различия в энергии связывания сульбактама с этими ферментами вызваны дополнительными взаимодействиями: в активном центре бета-лактамазы TEM-1 боковая цепь лизина 73 сближается с гидроксильной группой серина 70. Боковые цепи остатков серина 70, глутамата 166 и лизина 73 формируют кластер из заряженных атомов, оптимизируя их кулоновское притяжение друг к другу. В результате этих конформационных сдвигов лизин 73 располагается на большем расстоянии от карбоксильного кислорода сульбактама, чем в активном центре фермента TEM-37. Дополнительное электростатическое притяжение между карбоксильной группой сульбактама и протонированной аминогруппой

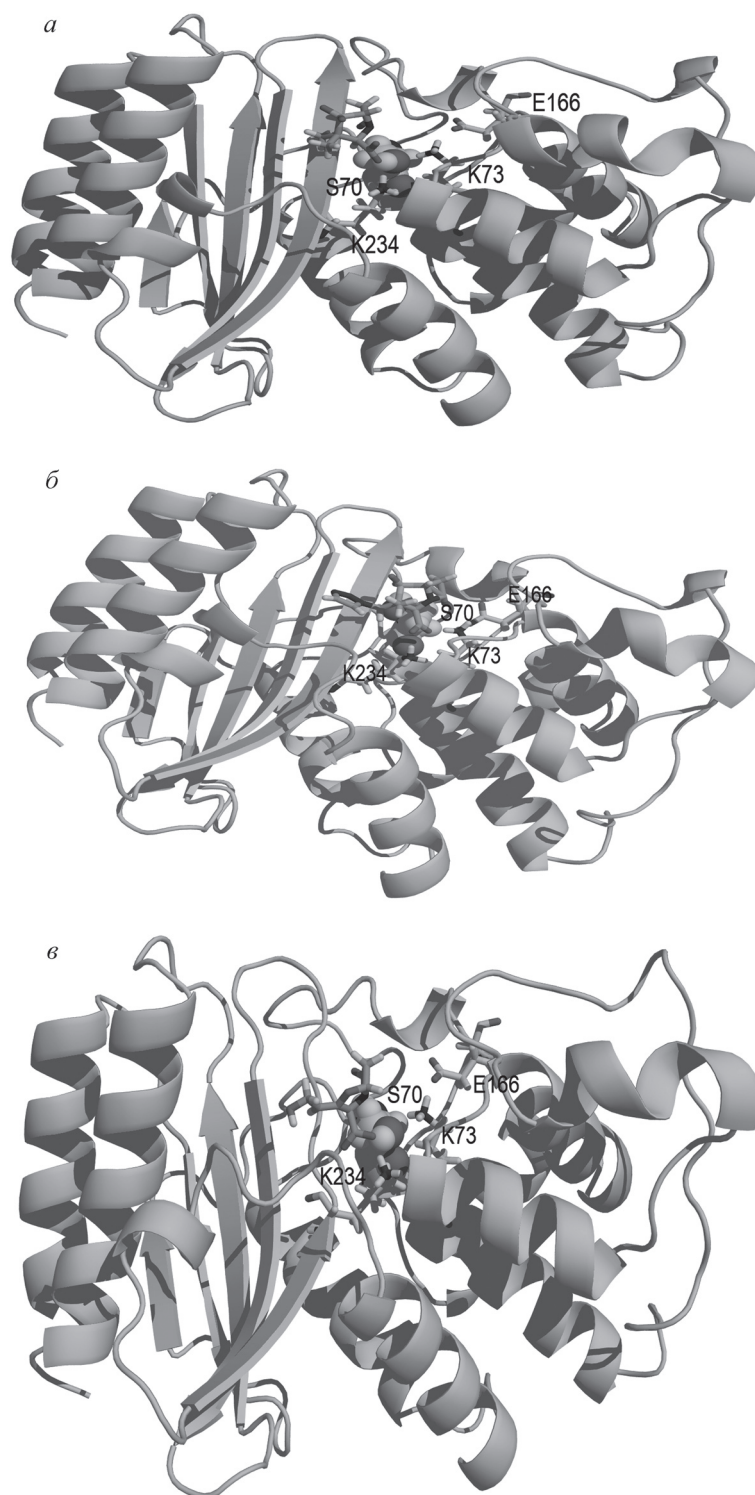


Рис. 3. Структура комплексов бета-лактамазы TEM-1 с сульбактамом (*а*), тазобактамом (*б*), клавуланат-ионом (*в*)

лизина 73 объясняет более сильное связывание сульбактама в активном центре фермента TEM-37 по сравнению с TEM-1. В силу своего размера этот ингибитор может не только передвигаться вдоль центра связывания ферментов, как CENTA и цефалотин, но и испытывать вращательные движения, оставаясь связанным с белком.

Средняя энергия связывания тазобактама с бета-лактамазой TEM-32 меньше, чем с ферментом TEM-37. Карбоксильная группа тазобактама взаимодействует в активном центре фермента TEM-32 с двумя лизинами 73 и 234. При связывании с ферментом TEM-37 ингибитор притягивается своей карбоксильной группой только к лизину

234. Аргинин 73 поворачивается своей протонированной аминогруппой к карбоксильной группе глутамата 166 и образует с ней солевой мостик. Комплекс тазобактама с ферментом TEM-37 можно назвать преацильным, поскольку карбонильный кислород ингибитора находится в непосредственной близости от гидроксильной группы каталитического серина 70, которая направлена в его сторону. В комплексе тазобактама с бета-лактамазой TEM-32 гидроксильная группа серина 70 повернута в противоположную сторону от субстрата, и процесс ацилирования для такой конформации невозможен.

Клавуланат-ион связывается с бета-лактамазой TEM-1 за счет следующих взаимодействий: карбоксильная группа бета-лактаманного кольца контактирует с протонированной аминогруппой лизина 234, водородная связь образуется между депротонированной карбоксильной группой и гидроксильной группой серина 70, гидроксильная группа ингибитора взаимодействует с положительно заряженной гуанидиновой группой аргинина 244. Серин 70 формирует водородную связь с боковой группой лизина 234, который взаимодействует также с депротонированной карбоксильной группой глутамата 166. Таким образом, лизин 234 не участвует в связывании клавуланата. Карбонильный кислород бета-лактаманного кольца удален от гидроксильной группы серина 70, что делает такую конформацию непригодной для акта ацилирования. Связывание клавуланата в активном центре бета-лактамазы TEM-37 обеспечивается за счет притяжения его карбоксильной группы одновременно к аминогруппам лизинов 73 и 234. Гидроксильная группа ингибитора полностью экспонирована в раствори-

тель и не участвует в связывании. По сравнению с ферментом TEM-1 в активном центре TEM-37 происходит конформационная перестройка: боковая цепь каталитического серина вытеснена из цепи трех взаимодействующих остатков (серин 70 – лизин 73 – глутамат 166). Положение ингибитора в активном центре готово для ацилирования, поскольку карбонильный кислород бета-лактаманного кольца находится в близком контакте с гидроксильной группой каталитического серина. Отличие в энергиях взаимодействия клавуланата с бета-лактамазами TEM-1 и TEM-37 вызвано дополнительным взаимодействием молекулы ингибитора с остатком аргинина 244.

Таким образом, в результате проведенного моделирования комплексообразования бета-лактамазы TEM-1 и трех ее мутантных форм TEM-32, TEM-37 и TEM-39 с субстратами и ингибиторами были установлены основные электростатические взаимодействия, обуславливающие стабильность образующихся комплексов. Было также показано, что ингибиторы связываются с мутантными формами бета-лактамаз, относящимися к ингибитор-устойчивому фенотипу, с большей аффинностью по сравнению с бета-лактамазой TEM-1.

Дальнейшие исследования будут направлены на получение более длительных динамических траекторий с использованием другого силового поля, что позволит выявить влияние параметров моделирования на параметры связывания. Проведение такого анализа на достаточно длительных траекториях позволит оценить вероятность перехода системы из комплекса связывания в преацильный комплекс при выборе новых ингибиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. World Health Organization, 2014. <http://www.who.int/drugresistance/en/>.
2. Tang S., Apisarnthanarak A. & Hsu L.Y. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2014. Vol.78. P. 3.
3. Drawz S.M., and Bonomo R.A. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 23. P. 160.
4. Bonomo R.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. Vol. 7. pii: a025239.
5. Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J. // *Lancet.* 2016. Vol. 387. P.176.
6. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J. et al // *New Microb. New Infect.* 2015. Vol. 6. P. 22.
7. Bebrone C., Moali C., Mahy F., Rival S., Docquier J.D., Rossolini G.M., Fastrez J., Pratt R.F., Frère J.M., Galleni M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45. P. 1868.
8. <http://www.cambridgesoft.com/software/overview.aspx>
9. Stewart J. J. P. // *J. Mol. Model.* 2007. Vol. 13. P. 1173.
10. Stewart J. J. P. // *Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, http://OpenMOPAC.net*
11. Zoete V., Cuendet M. A., Grosdidier A., Michielin O. // *J. Comput. Chem.* 2011. Vol. 32. P. 2359.
12. MacKerell A.D. Jr., Banavali N., Foloppe N. // *Biopolymers.* 2000. Vol. 56. P. 257.
13. Jelsch C., Mourey L., Masson J.M. & Samama J.P. // *Proteins.* 1993. Vol. 16. P. 364.
14. Wang X., Minasov G., Shoichet B.K. // *J.Biol.Chem.* 2002. Vol. 277. P. 32149.
15. Humphrey W., Dalke A., Schulten, K. // *J. Molec. Graphics.* 1996. Vol. 14. P. 33.

16. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K. // *J. Comput. Chem.* 2005. Vol. 26. P. 1781.
17. Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu., Deygen I.M., Antipin R.L., Majouga A.G., Egorov A.M., Beshnova D.A., Kallio J., Hackenberg C., Lamzin V.S. // *Biochimie.* 2017. Vol. 132. P. 45.
18. Chaibi E.B., Peduzzi J., Farzaneh S., Barthelemy M., Sirot D., Labia R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. Vol. 1382. P. 38.
19. Bermudes H., Jude F., Chaibi E.B., Arpin C., Bebear C., Labia R., Quentin C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43. P. 1657.
20. Robin F., Delmas J., Archambaud M., Schweitzer C., Chanal C., Bonnet, R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50. P. 2403.
21. Neuwirth C., Labia R., Siebor E., Pechinot A., Madec S., Chaibi E.B., Kazmierczak A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. Vol. 44. P. 453.
22. Raquet X., Lamotte-Brasseur J., Fonce E., Gousard S., Courvalin P., Frere, J.M. // *J. Mol. Biol.* 1994. Vol. 244. P. 625.

Поступила в редакцию 24.11.17

STUDY OF THE INTERACTION OF TEM TYPE BETA-LACTAMASES WITH SUBSTRATES AND INHIBITORS BY MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION

I.V. Uporov, V.G. Grigorenko, M.Yu. Rubtsova*, A.M. Egorov

(enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: mrubtsova@gmail.com)

Molecular dynamics simulation approach was applied to study complexes of beta-lactamase TEM-1 and its mutants TEM-32, TEM-37, TEM-39 with substrates (CENTA, cephalothin) and serine beta-lactamase inhibitors (sulbactam, tazobactam, and clavulanic acid). For all the complexes examined, the main binding mode was identified as the electrostatic attraction between the deprotonated carboxyl group of the beta-lactam ring of the substrate (inhibitor) and the positively charged NH_3^+ groups of active site lysines 73 and 234. For some complexes, a hydrogen bond is also observed between this substrate group or its carbonyl oxygen with hydroxyl group of catalytic serine 70. Negatively charged groups of lengthy substrates (CENTA and cephalothin) interact with the positively charge region formed by the guanidine group of arginine 244 and amino group of asparagine 276. These electrostatic interactions are the main driving force leading to substrate binding in the active site of beta-lactamases. It is shown that the binding energy of substrate CENTA with TEM-1 beta-lactamase is lower than that for cephalothin with the same protein. This difference in mean energies results in a significantly lower Michaelis constant for CENTA than for cephalothin, which has been experimentally confirmed. Our data indicate also that inhibitors bind to beta-lactamases with inhibitor resistance phenotype (TEM-32, TEM-37, TEM-39), with greater affinity than with beta-lactamase TEM-1.

Key words: molecular dynamics, TEM type beta-lactamases, CENTA, cephalothin, sulbactam, tazobactam, clavulanic acid, antibiotic resistance.

Сведения об авторах: Упоров Игорь Владимирович – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук (iuporov@gmail.com); Григоренко Виталий Георгиевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com); Рубцова Майя Юрьевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (mrubtsova@gmail.com); Егоров Алексей Михайлович – гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, акад. РАН (alex.m.egorov@gmail.com).