

УДК 577.332

## МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ МЕТАЛЛО- $\beta$ -ЛАКТАМАЗЫ ОКСАЦЕФАЛОСПОРИНОВЫМ АНТИБИОТИКОМ

М.Г. Хренова\*, А.М. Кулакова, Б.Л. Григоренко, А.В. Немухин

(кафедра физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;  
e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)

Металло- $\beta$ -лактамазы – семейство бактериальных цинк-зависимых ферментов, гидролизующих  $\beta$ -лактамовые антибиотики и отвечающие за резистентность бактерий к ним. Медленно гидролизующийся субстрат моксалактам в результате реакции претерпевает не только химические превращения в структуре  $\beta$ -лактамного кольца, происходит также отделение отрицательно заряженного фрагмента на периферии молекулы, в результате чего образуется интермедиат, прочно связанный с активным центром. В работе представлены результаты расчетов механизма данного процесса комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики.

**Ключевые слова:** ферментативный катализ, резистентность бактерий, моксалактам, антибиотики.

Постоянно развивающаяся резистентность бактерий к уже известным антибиотикам обуславливает необходимость поиска новых соединений, а также изучения молекулярных механизмов взаимодействия уже известных антибиотиков с  $\beta$ -лактамазами. Эти ферменты отвечают за гидролиз связи С–N в  $\beta$ -лактамном кольце соединения, что приводит к образованию продукта, не способного ингибировать целевые ферменты – пенициллин-связывающие белки. Среди  $\beta$ -лактамаз наименее изученными и одновременно наиболее реакционноспособными являются металло- $\beta$ -лактамазы, содержащие в активном центре один или два катиона цинка [1–2]. Этот класс ферментов содержится в грамотрицательных бактериях и вызывает сложности в борьбе с ними. Многие хорошо известные антибиотики пенициллинового и цефалоспоринового рядов легко гидролизуются этими ферментами [3], что связано с высокой реакционной способностью нуклеофила в активном центре. Однако такое соединение оксацефалоспориновой группы как моксалактам гидролизуется медленно с константой скорости  $0,29 \text{ с}^{-1}$  [3]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, образуется продукт реакции, связанный с активным центром фермента и не содержащий 1-метилтетразолил-5-тиолята, который присутствовал в исходном соединении [4]. Можно предположить, что именно эти трансформации отвечают за наблюдаемые ингибирующие свойства.

В настоящей работе применяли комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) для изучения механизма реакции в активном центре фермента. Использовали

кристаллическую структуру PDB2AIO металло- $\beta$ -лактамазы из бактерии *Stenotrophomonas maltophilia* с гидролизованной формой моксалактама [4]. В модельную систему включены фермент, субстрат, два катиона цинка активного центра и молекулы воды, образующие сольватную оболочку. Поскольку активный центр лежит на поверхности фермента, для правильного и равномерного учета электростатических взаимодействий необходимо включать в модельную систему значительное число молекул растворителя. В качестве критерия были выбраны расстояния до границы сольватной оболочки от активного центра фермента ( $12 \text{ \AA}$ ) и от остальной его поверхности ( $4 \text{ \AA}$ ) (рис. 1). Расчеты проводили с помощью программы NWChem [5]. КМ-подсистему, состоящую из субстрата, атакующего гидроксид-аниона, двух катионов цинка вместе с их координационными сферами, а также ряда остатков, образующих водородные связи в активном центре, описывали методом функционала электронной плотности с гибридным функционалом PBE0 [6] и эмпирической дисперсионной поправкой Grimme D3 [7] с базисными наборами 6-31G\*\*. ММ-подсистему описывали классическим силовым полем AMBER [8].

На основании полученной кристаллической структуры, содержащей один из продуктов реакции, в работе [4] был предложен механизм процесса, однако детали механизма можно уточнить, только опираясь на данные молекулярного моделирования, проведенного в настоящей работе.

На рис. 2 показан механизм превращений в активном центре фермента и соответствующее ему сечение поверхности потенциальной энергии

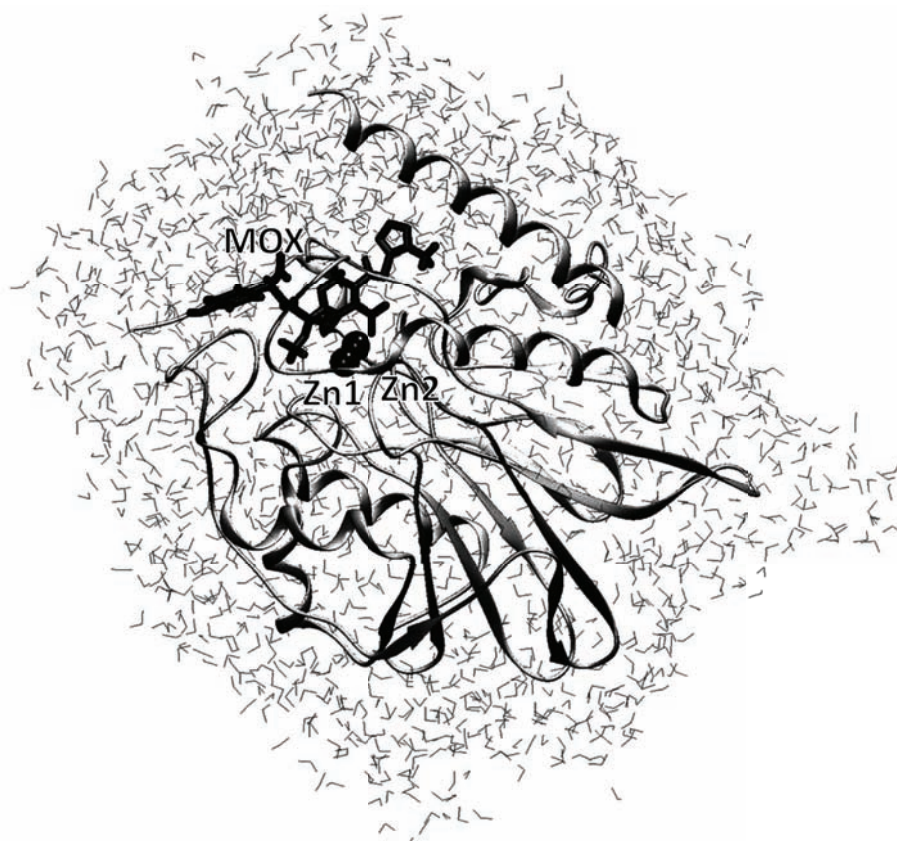


Рис. 1. Модельная система комплекса металло- $\beta$ -лактамазы из бактерии *S. maltophilia* и моксалактама. Лентами показана пространственная структура белка, сферами – катионы цинка, серыми линиями – молекулы воды сольватной оболочки и стержнями – молекула моксалактама. Система построена на основе структуры PDB2A1O

вдоль координаты реакции (рис. 3). Первая отличительная черта данной реакции гидролиза состоит в том, что в качестве нуклеофила выступает гидроксид-анион, а не молекула воды. Это связано с тем, что в фермент-субстратном комплексе нуклеофил координирован двумя катионами цинка, что сильно понижает значение его  $pK_a$ . Можно предположить, что такое строение активного центра не случайно. Сравним рассматриваемую реакцию с гидролизом амидной группы, где по стехиометрии требуется молекула воды, из которой кислород образует ковалентную связь с атомом углерода, а два протона – с атомом азота разрываемого фрагмента. В нашем случае при гидролизе  $\beta$ -лактамного кольца атом кислорода также образует ковалентную связь с атомом углерода, а атом азота разрываемого фрагмента может принять только один протон; это связано с тем, что его неподеленная пара вовлечена в сопряженную систему двойных связей.

На первой стадии реакции происходит нуклеофильная атака гидроксид анионом карбонильного углерода субстрата с образованием тетраэдрического интермедиата (II). Расстояние C...O нуклео-

фильной атаки составляет 2,66 Å, что является типичным для ферментативных реакций гидролиза [9–10]. Барьер первой стадии реакции составляет 14,3 ккал/моль (что при пересчете по теории активированного комплекса соответствует константе скорости  $200 \text{ c}^{-1}$ ), следовательно, данная стадия не является лимитирующей для всего процесса. Образованный на первой стадии интермедиат характеризуется структурой с дополнительной координационной связью между атомом кислорода субстрата и катионом цинка  $\text{Zn1}^{2+}$ . Вторая стадия происходит практически без барьера (барьер составляет 1,5 ккал/моль) и сводится к разрыву связи C–N, сопряженному с переносом протона с субстрата на каталитический остаток Asp120. Эта стадия сопровождается стабилизацией второго интермедиата (энергия относительно фермент-субстратного комплекса составляет 1,4 ккал/моль), вызванной образованием новой координационной связи атома азота разрываемого фрагмента и катиона  $\text{Zn2}^{2+}$ . Согласно результатам молекулярного моделирования на следующей стадии может происходить перенос протона с аспарагиновой кислоты активного центра Asp120 на атом азота, од-

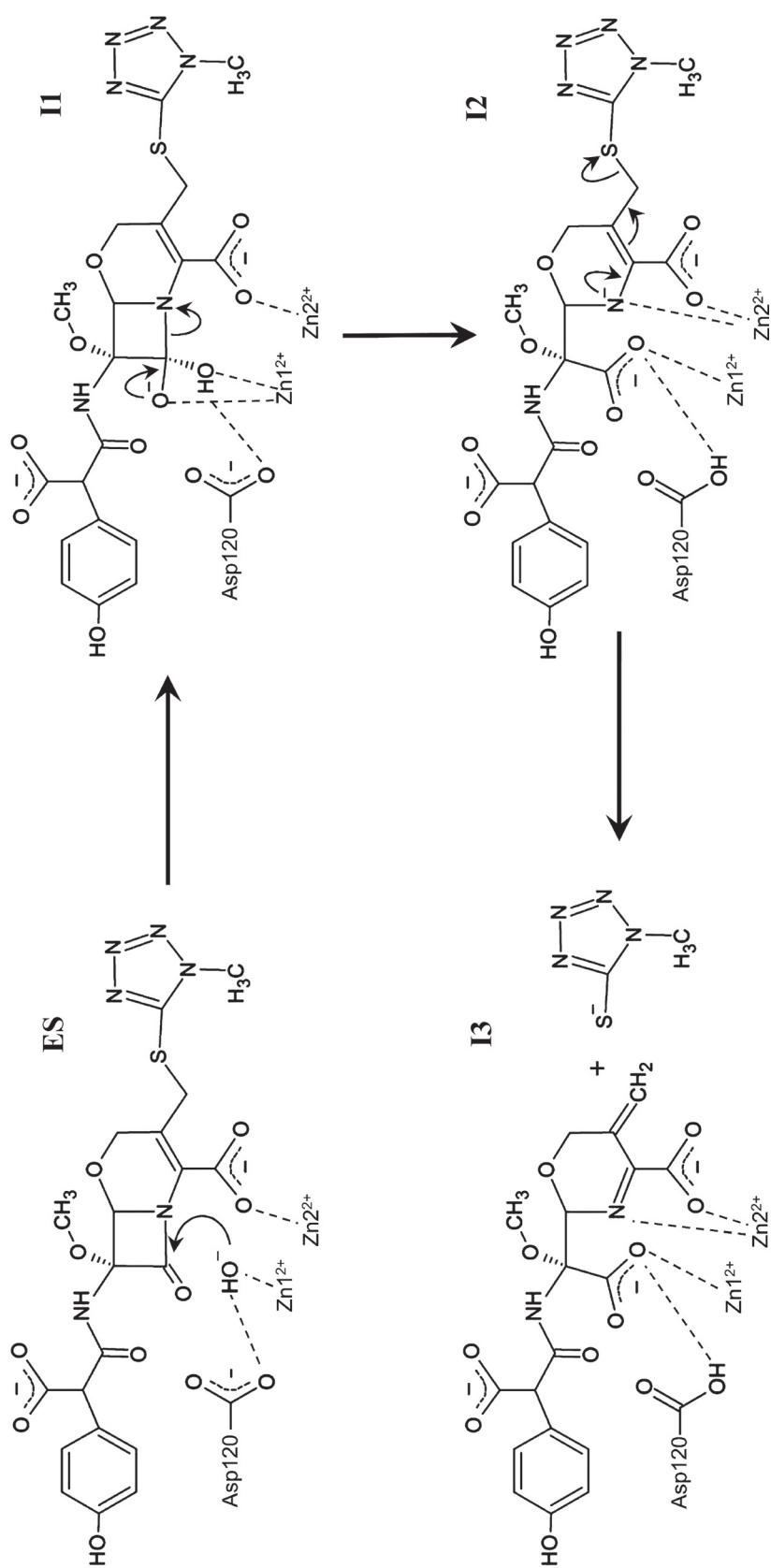


Рис. 2. Механизм реакции гидролиза оксалактама металло-β-лактамазой из *S. maltophilia*. Серыми пунктирными линиями обозначены ключевые водородные и координационные связи

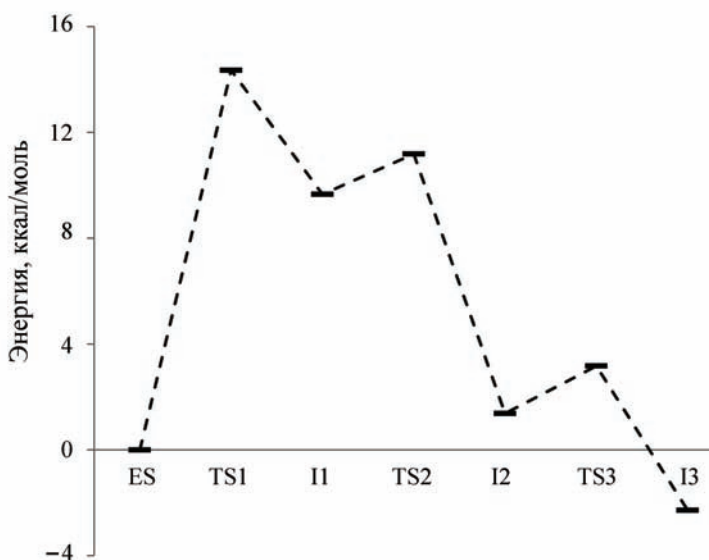


Рис. 3. Сечение поверхности потенциальной энергии реакции гидролиза моксалактама в активном центре металло-β-лактамазы

нако такой процесс очень затратный по энергии и поэтому не является предпочтительным. Как альтернативный малозатратный процесс (барьер составляет 1,8 ккал/моль), можно рассматривать распад интермедиата за счет отделения 1-метилтетразолил-5-тиолята. Атом азота интермедиата (I3), образовавшегося в результате этого процесса, не обладает столь выраженным отрицательным зарядом и не является привлекательным акцептором протона с аспарагиновой кислоты, однако продолжает координировать катион  $Zn^{2+}$ . При попытках дальнейшего описания процесса, в том числе диссоциации комплекса I3, были отмечены большие энергетические барьеры (бо-

лее 20 ккал/моль), что объясняет возможность появления такого комплекса в кристаллической структуре.

При подведении итога следует подчеркнуть получение двух основных результатов. В работе решена задача по изучению механизма реакции гидролиза антибиотика моксалактама металло-β-лактамазой. Важный прикладной аспект связан с тем, что если в структуру антибиотика внедрить функциональную группу, которая может легко уходить, забирая с собой отрицательный заряд, то такие соединения будут гораздо хуже гидролизываться рассматриваемым классом ферментов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-13-00077), с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [11].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meini M.-R., Llarrull L.I., Vila A.J. // FEBS Lett. 2015. Vol. 589. P. 3419.
2. Crowder M.W., Spencer J., Vila A. J. // Acc. Chem. Res. 2006. Vol. 39. P. 721.
3. Crowder M.W., Walsh T.R., Banovic L., Pettit M., Spencer J. // Antimicrob. Agents Chemother. 1998. Vol. 42. P. 921.
4. Spencer J., Read J., Sessions R.B., Howell S., Blackburn G.M., Gamblin S.J. // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127. P. 14439.
5. Valiev M., Bylaska E.J., Govind N., et al. // Comput. Phys. Commun. 2010. Vol. 181. P. 1477.
6. Adamo C., Barone V. // J. Chem. Phys. 1999. Vol. 110. P. 6158.
7. Grimme S. // J. Chem. Phys. 2003. Vol. 118. P. 9095.
8. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., et al. // J. Am. Chem. Soc. 1995. Vol. 117. P. 5179.
9. Vasilevskaya T., Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Thiel W. // J. Comput. Chem. 2016. Vol. 37. P. 1801.
10. Kots E.D., Khrenova M.G., Lushchekina S.V., Varfolomeev S.D., Grigorenko B.L., Nemukhin A.V. // J. Phys. Chem. B. 2016. Vol. 120. P. 4221.
11. Воеводин Вл.В., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин Вад.В. // Открытые системы. СУБД. 2012. С. 36.

## MECHANISM OF METALLO- $\beta$ -LACTAMASE INHIBITION BY OXACEPHALOSPORIN ANTIBIOTIC

M.G. Khrenova\*, A.M. Kulakova, B.L. Grigorenko, A.V. Nemukhin

(M.V. Lomonosov State University, Faculty of Chemistry, Division of Physical Chemistry;  
\*e-mail: wasabiko@lcc.chem.msu.ru)

**Metallo- $\beta$ -lactamase is a family of bacterial zinc dependent enzymes that hydrolyzes  $\beta$ -lactam antibiotics and is responsible for the drug resistance of bacteria. The slowly hydrolyzed substrate moxalactam undergoes chemical transformations comprising not only the C-N bond cleavage, but also release of the 1-methyltetrazolyl-5-thiolate anion. This results in the formation of an intermediate firmly bound to the active site. In this paper we present the results of the calculations applying the combined quantum mechanics molecular mechanics approach, which describe the molecular mechanism of this process.**

**Key words:** enzyme catalysis, bacterial resistance, moxalactam, antibiotics.

**Сведения об авторах:** *Хренова Мария Григорьевна* – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. физ.-матем. наук (khrenova.maria@gmail.com); *Кулакова Анна Михайловна* – аспирант кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (kulakova@lcc.chem.msu.ru); *Григоренко Белла Людвиговна* – вед. науч. сотр. лаборатории химической кибернетики кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. физ.-матем. наук (bell\_grig@yahoo.com); *Немухин Александр Владимирович* – профессор кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, лаборатория химической кибернетики, докт. хим. наук (anem@lcc.chem.msu.ru).