

Моделирование структуры комплексов металло-бета-лактамаз с ингибиторами и изучение их физико-химических свойств

П.С. Белозеров

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение

Возникновение и развитие устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков является одной из острых проблем в современном мире. Одним из основных механизмов резистентности микроорганизмов к β -лактамам является их гидролиз ферментами β -лактамазами. К настоящему времени описано более 2000 ферментов, способных гидролизовать β -лактамы. Высокая скорость их мутирования, способность к быстрому распространению при передаче генетических элементов представляет глобальную угрозу.

NDM-1 (New Delhi metallo- β -лактамаза-1) представляет собой фермент из класса металло- β -лактамаз (МБЛ). Цинк в активном центре фермента придает бактериям устойчивость к широкому спектру β -лактамовых антибиотиков. В настоящее время не существует клинически одобренных ингибиторов, способных эффективно блокировать NDM-1, что подчеркивает необходимость разработки новых терапевтических подходов для борьбы с инфекциями, вызванными NDM-1-продуцирующими микроорганизмами [2].

Цель

Исследование заключается в выделении и очистке МБЛ NDM-1 для кристаллизации и для последующего скрининга соединений с целью поиска новых ингибиторов для преодоления антибиотикорезистентности. Работа направлена на детальный анализ структуры белка и исследование динамики его ключевых элементов, для более глубокого понимания механизма действия NDM-1 для поиска и оценки эффективности синтезированных ингибиторов.

Материалы и методы

NDM это липид связывающий белок и локализуется в мембранах в связи с этим вызывает трудности наработка большого количества фермента достаточной чистоты для скрининга и кристаллизации.

Решение данной задачи может быть достигнуто путем удаления сигнального пептида непосредственно в цитоплазме. Для реализации этого подхода были заказаны специфические праймеры, по которым осуществили амплификацию необходимого участка гена. Полученный амплифицированный продукт был клонирован в соответствующий вектор, после чего проведена проверка правильности клонирования. Рекombinantный вектор был трансформирован в продуцентный штамм. После трансформации из полученного штамма была осуществлена экспрессия и дальнейшая очистка белка.

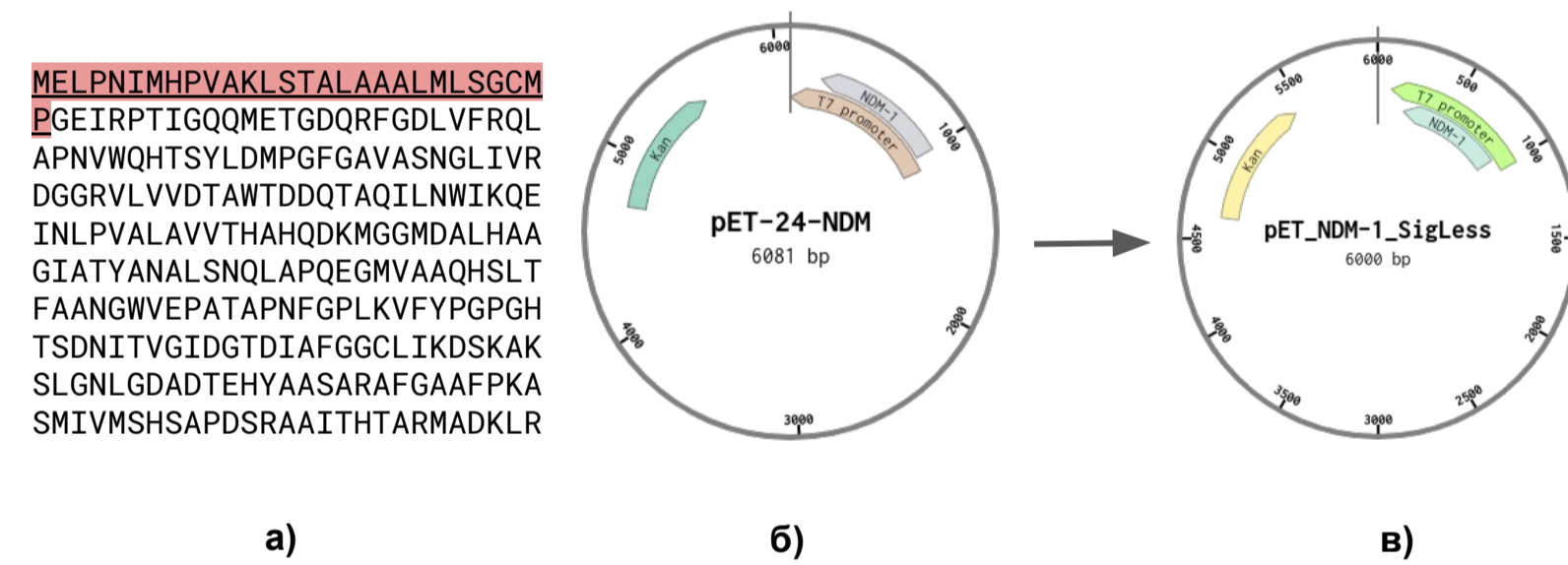
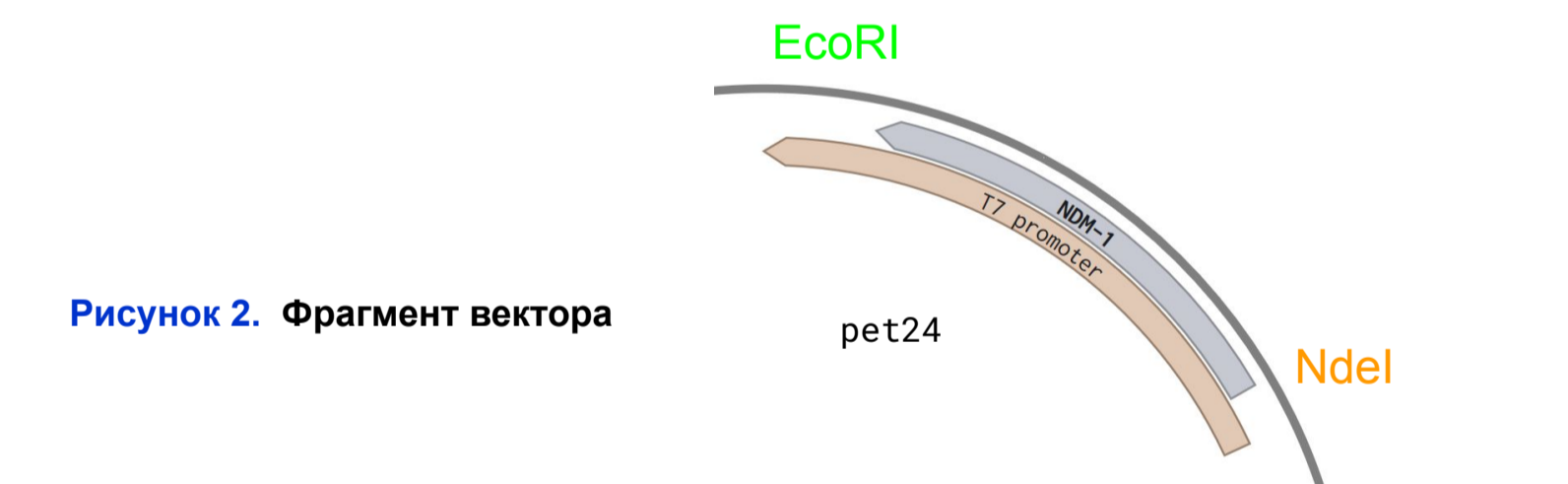
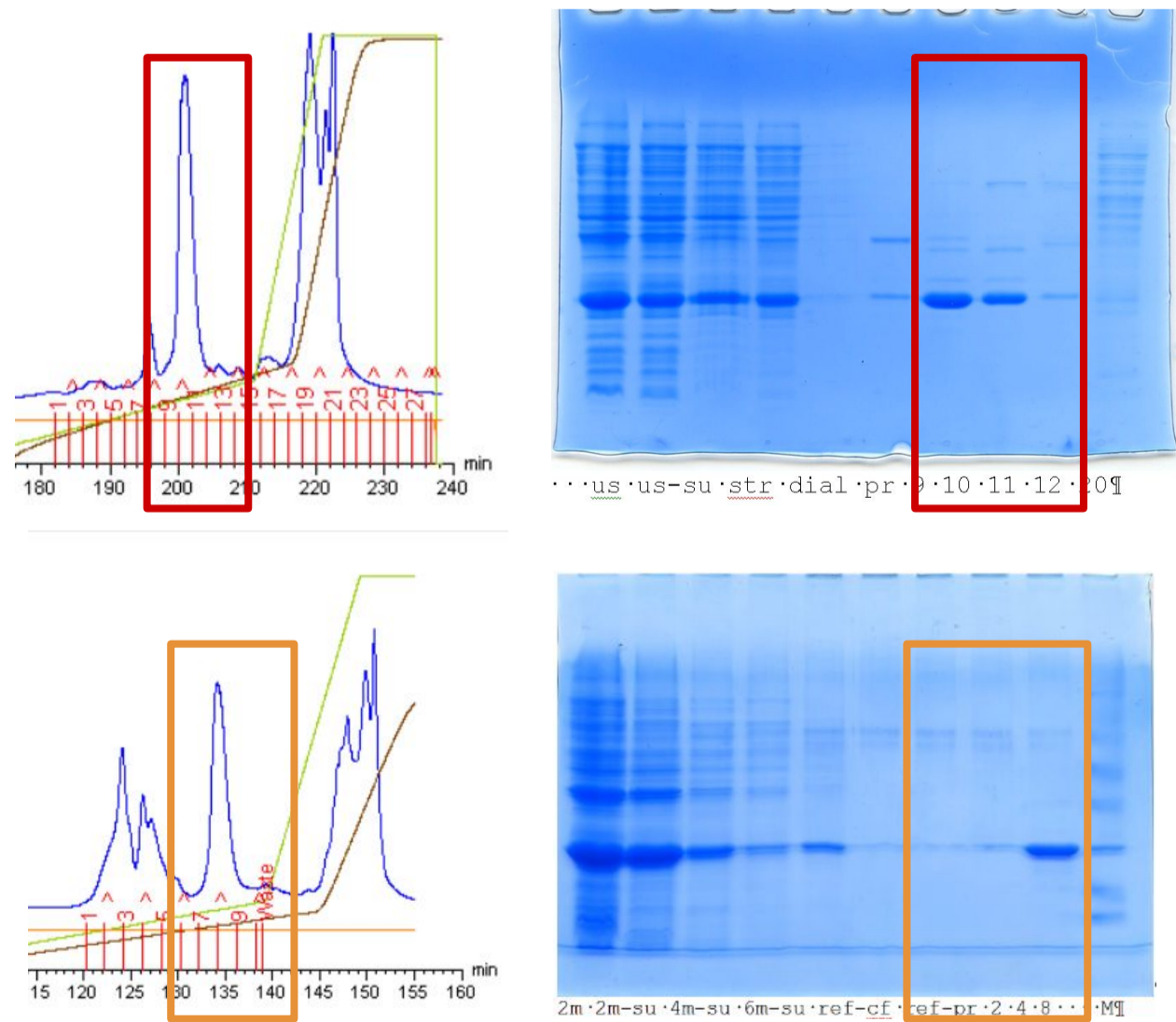


Рисунок 1. а) Аминокислотная последовательность МБЛ NDM-1 с сигнальным пептидом. б) вектор с сигнальным пептидом. в) вектор без сигнального пептида



Белок выделяли двумя методами — из растворимой фракции и из тел включений. При использовании анионообменной хроматографии для очистки растворимой фракции, не удалось полностью устранить примеси других белков. Наилучший результат был получен при выделении белка из тел включений, которые растворяли в 2M мочеvine, после чего проводили ренатурацию белка путем разбавления и последующую очистку с использованием хроматографии.



Результаты

Совместно с Институтом Гаузе проводится углубленный скрининг соединений, обладающих схожей структурой, представленной на рисунке 1. Эти соединения были тщательно отобраны на основе их потенциальной способности ингибировать ферментативную активность целевого белка. В ходе первичного анализа определены соединения, характеризующиеся значением IC_{50} порядка 1 мкМ, что указывает на их высокую эффективность в качестве ингибиторов. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения этих соединений для разработки потенциальных терапевтических агентов.

Рисунок 4. Структура потенциального ингибитора LCTA-3846

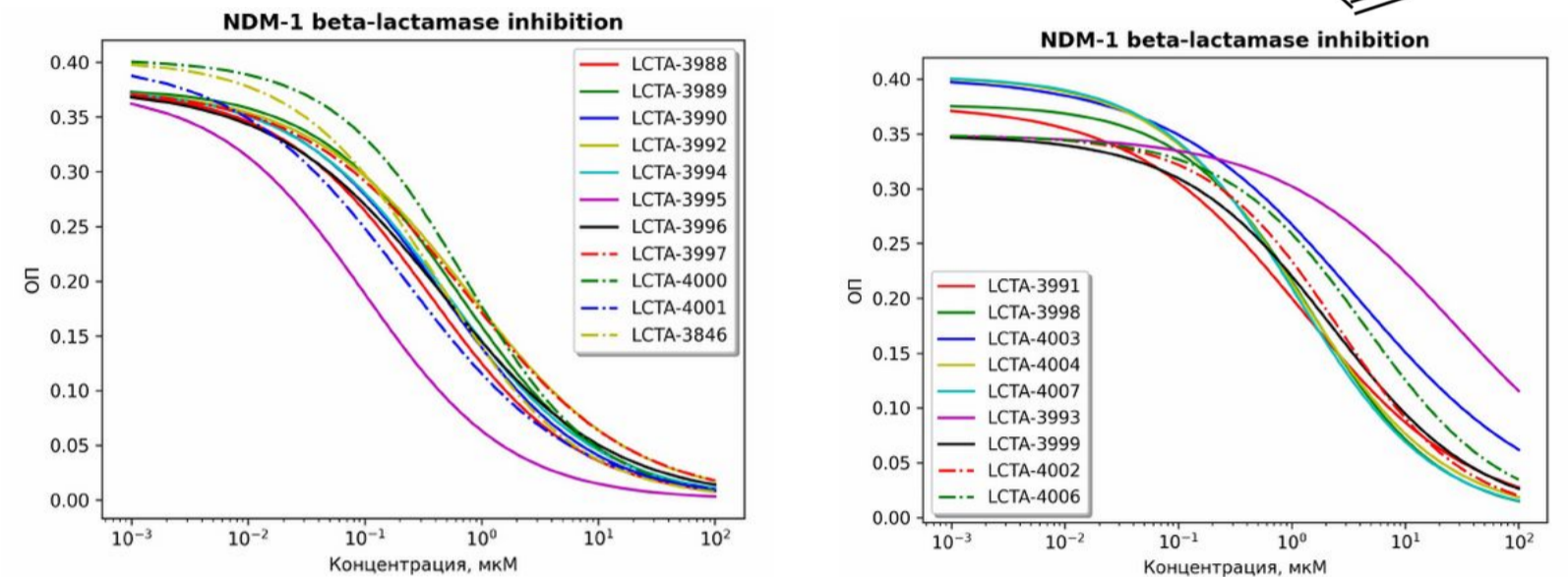
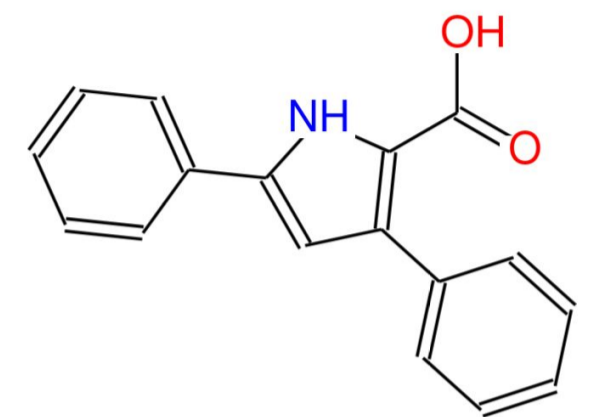


Рисунок 5. Профиль ингибирования гидролиза хромогенного субстрата CENTA металло-бета-лактамазой NDM-1 в присутствии соединений LCTA.

Дополнительно, в рамках совместных исследований с кафедрой физической химии были получены важные данные, касающиеся пространственной структуры и динамики ключевых петель в активном центре фермента NDM-1. Особое внимание было уделено так называемой омега-петле, которая играет критическую роль в каталитической активности фермента и его способности взаимодействовать с различными ингибиторами. Эти исследования позволили не только детально охарактеризовать структурные особенности омега-петли, но и выявить её влияние на конформационные изменения фермента при связывании с ингибиторами. Полученные результаты значительно углубили наше понимание механизма действия NDM-1, что в свою очередь открывает новые возможности для рационального дизайна высокоэффективных ингибиторов, способных преодолеть устойчивость к β -лактамам антибиотикам.

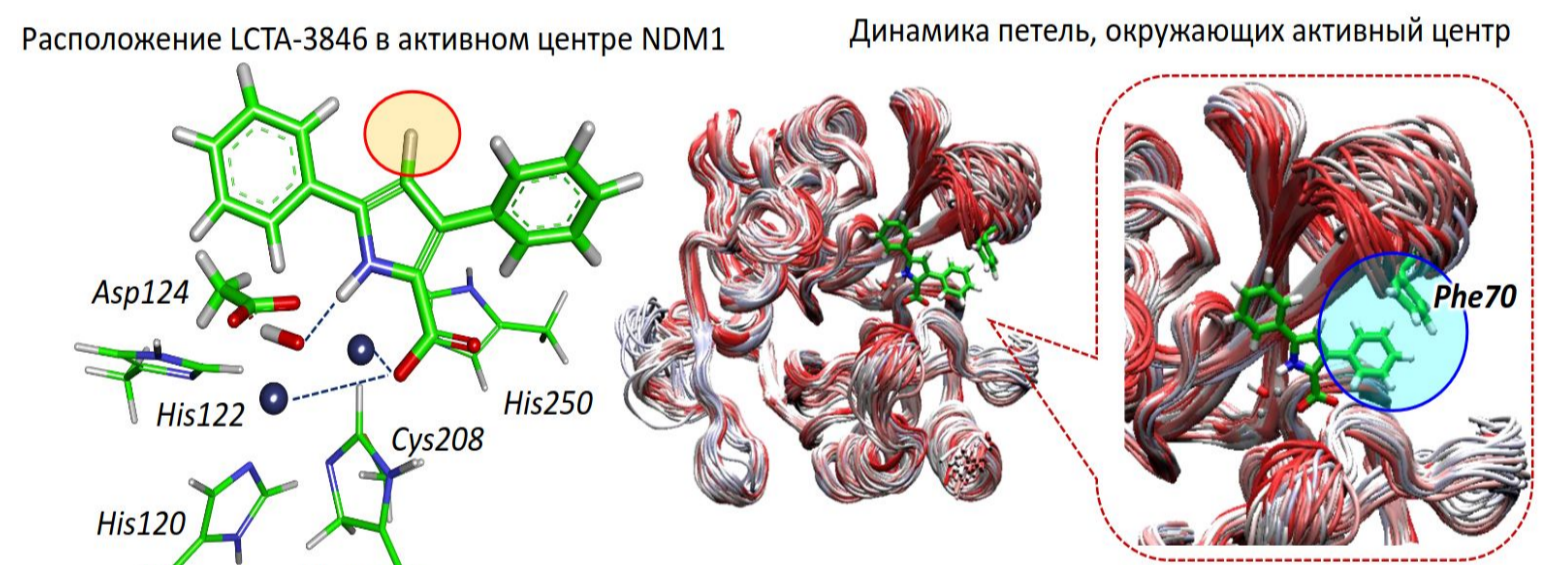


Рисунок 6. LCTA-3846 и общая структура связывания в активном центре

Выводы

В результате исследования был успешно разработан протокол экспрессии и очистки МБЛ NDM-1, что позволило получить достаточное количество фермента для дальнейших экспериментов, включая скрининг потенциальных ингибиторов и кристаллизацию. В ходе скрининга соединений из института Гаузе были выявлены соединения с высокой константой ингибирования. Дополнительно, совместные исследования с кафедрой физической химии предоставили важные данные о структуре и динамике петель в NDM-1, что углубило понимание механизма действия фермента и его взаимодействия с ингибиторами.

Библиография

- <http://www.transparencymarketresearch.com/antibacterial-drugs-market.html>
- Sander S. B. и др. Assay Platform for Clinically Relevant Metallo- β -lactamases // J. Med. Chem. 2013. Т. 56. № 17. С. 6945–6953.

