МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2020, том 54, № 1, с. 153–163

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 579.61(577.322)

In silico СКРИНИНГ ФЛАВОНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ КВОРУМ-СЕНСИНГ РЕГУЛЯТОРА LasR *Pseudomonas aeruginosa*[1, 2]

© 2020 г. Н. Абелян[a, *], О. Грабский[b], С. Тирацуян[a, b]

[a] *Институт биомедицины и фармации Российско-Армянского университета, Ереван, 0051 Армения*

[b] *Факультет биологии Ереванского государственного университета, Ереван, 0025 Армения*

**e-mail: narek.abelyan@rau.am*

Поступила в редакцию 20.04.2019 г.
После доработки 20.04.2019 г.
Принята к публикации 06.05.2019 г.

Резистентность к антибиотикам – глобальная проблема общественного здравоохранения. В 2017 г. ВОЗ опубликовала список супербактерий, среди которых критически приоритетна *Pseudomonas aeruginosa*. Классические методы борьбы против бактериальных сообществ неэффективны, потому что они создают биопленки, придающие повышенную устойчивость к антибиотикам и иммунным реакциям хозяина. Сущность новых стратегий состоит в том, чтобы "не убить, а разоружить" патоген, предполагая, что устойчивость к таким антивирулентным соединениям будет вырабатываться медленнее. Известно, что в системе кворум-сенсинга *P. aeruginosa* система LasI/LasR основная. Рецепторный белок LasR активирует связывание с нативным аутоиндуктором. Многие флавоноиды и их производные используют как антибактериальные компоненты лекарств. Цель нашей работы – выявление соединений, которые будут ингибировать LasR. Это приведет к подавлению синтеза факторов вирулентности, тем самым лишая бактерии вирулентности. Чтобы получить согласованные прогнозы, в работе проведен высокопроизводительный виртуальный скрининг с использованием программных пакетов AutoDock Vina, rDock, LeDock. Результаты виртуального скрининга позволяют предположить, что бензамиды, синтетические производные флавонов, потенциально способны ингибировать регулятор транскрипции LasR. Это согласуется с недавно опубликованными экспериментальными данными, которые показывают высокую антибактериальную активность бензамидов. Выбранные соединения взаимодействуют с лигандсвязывающим доменом LasR с более высокой аффинностью, чем с ДНК-связывающим доменом. С помощью конформационного анализа среди отобранных соединений обнаружено, что существуют такие, которые связываются с теми же аминокислотами лигандсвязывающего домена, что и нативный аутоиндуктор. Это указывает на возможность конкурентного взаимодействия этих соединений. Также установлен ряд соединений, которые связываются с другими консервативными аминокислотами лигандсвязывающего домена, что интересно для дальнейшего их анализа. Отобранные соединения соответствуют критериям, необходимым для их рассмотрения в качестве лекарственных средств, и могут служить основой для проведения дальнейших экспериментов *in vitro*/*in vivo* и разработки современной противоинфекционной терапии, основанной на QS-системе *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, *Pseudomonas aeruginosa*, кворум-сенсинг, LasR, бензамид, виртуальный скрининг, флавон, молекулярный докинг

DOI: 10.31857/S0026898420010024

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность к антибиотикам – глобальная проблема современности, каждый год в США, как минимум 2 миллиона человек получают резистентную к антибиотикам инфекцию, и, по меньшей мере, 23000 человек умирают [1]. В 2017 г. ВОЗ публикует список бактерий, для которых срочно необходимы новые антибиотики, и критической приоритетностью обладает синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) [2]. Эти бактерии размножаются в организме хозяина, а

[1] К статье имеются дополнительные материалы, доступные для авторизированных пользователей по doi: 10.1134/S0026898420010024.

[2] Статья представлена авторами на английском языке.

Сокращения: QS – кворум-сенсинг; LBD – лигандсвязывающий домен; DBD – ДНК-связывающий домен; PubChem – база данных химических соединений; OdDHL – N-(3-оксододеканоил)-L-гомосеринлактон; BHL – N-бутаноил-L-гомосеринлактон; PQS – *Pseudomonas* хинолоновая система; IQS – интегрированная система кворум-сенсинга; HAQ – 4-гидрокси-2-алкилхинолин; HSL – N-ацил-гомосеринлактон; HIA (Human Intestinal Absorption) – адсорбция желудочно-кишечным трактом человека; BBB (Blood-Brain Barrier) – гематоэнцефалический барьер.

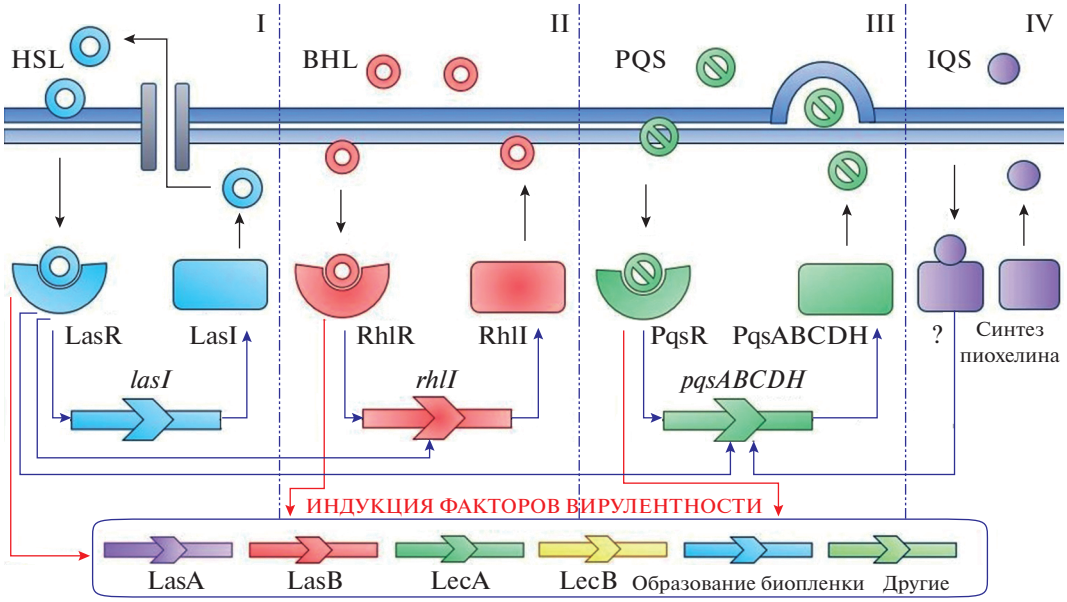

Рис. 1. Четыре типа систем кворум-сенсинга *P. aeruginosa*: I – Las, II – Rhl, III – PQS и IV – IQS.

при достижении определенной концентрации, именуемой QS, объединяются в сообщества (биопленки) [3, 4]. Секретируя молекулярные сигналы, ответственные за клеточную коммуникацию, бактерии могут совместно принимать решения для приспособления к особенностям среды и защиты. Биопленки способствуют экспрессии генов вирулентности, включая гены резистентности к антибиотикам и множественной лекарственной резистентности, а также представляют собой физический барьер, предотвращающий проникновение вредных веществ, в том числе и антибиотиков [5, 6].

У *P. aeruginosa* обнаружены четыре типа сигнальных систем кворум-сенсинга. Две из них основаны на ацилгомосеринлактонах HSLs: OdDHL и BHL. Данные аутоиндукторы распознают две разные сигнальные системы, каждая из которых включает рецептор типа LuxR и синтазу типа LuxI. LasI синтезирует OdDHL, который связывается с рецептором LasR [7, 8]. RhlI синтезирует BHL, который взаимодействует с рецепторным белком RhlR [9, 10]. Эти две системы интегрированы с третьей, в которой использованы химически отличные от HSLs сигнальные молекулы: 2-гептил-3-гидрокси-4(1H)-хинолон. Третья система названа PQS [11]. Четвертая система IQS недостаточно изучена, а рецептор IQS не идентифицирован [12]. В регуляции кворум-сенсинга *P. aeruginosa* существует иерархия, согласно которой активация LasR ведет за собой дальнейшую активацию систем RhlR и PQS. Именно по этой причине LasR представляет больший интерес в плане дальнейших исследований [4] (рис. 1).

В присутствии зрелых биопленок *P. aeruginosa* фагоциты не могут осуществлять фагоцитоз из-за наличия экзополисахаридной поверхности биопленок. С другой стороны, бактерии могут продолжать агрессивно реагировать на присутствие лейкоцитов, регулируя производство ряда QS-контролируемых факторов вирулентности, включая рамнолипиды [13], цианиды, антибиотик пиоцианин [14], и экзополисахариды [15], которые затем окружают биопленку и влияют на проникновение иммунных клеток.

Подход, направленный на исправление этой ситуации, предполагает разработку соединений, не убивающих патогенные бактерии, но ингибирующих или инактивирующих их факторы вирулентности. Иначе говоря, стратегия состоит в том, чтобы “не убить, а разоружить” патоген. Предполагаем, что устойчивость к таким антипатогенным соединениям будет вырабатываться медленнее, поскольку они не будут влиять непосредственно на жизнеспособность бактерий, а будут действовать только на их способность инфицировать человека.

Цель этой работы – найти соединения, которые будут препятствовать функционированию LasR. Это приведет к подавлению образования биопленок и синтеза факторов вирулентности. Высокопроизводительный *in vitro* скрининг – один из наиболее эффективных и хорошо зарекомендовавших себя методов, используемых в области разработки лекарственных препаратов. Однако на сегодняшний день широко признано предварительное использование *in silico* методов, что уменьшает количество тестируемых соединений для дальнейших экспериментов *in vitro* и *in vivo*, тем самым

снижая их высокую стоимость. Также это сокращает время исследований и увеличивает вероятность обнаружения биологически активных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Подготовка структуры белка и идентификация сайтов связывания. Из-за плохой растворимости белка LasR отсутствуют кристаллографические данные о полной структуре рецептора. В связи с этим в качестве мишени впервые взята виртуально реконструированная полная структура рецептора LasR [16]. Сайты связывания также взяты из работы [16] и проверены с помощью программы MetaPocket [17]. В результате идентифицировано 2 основных связывающих кармана, один из которых расположен в лигандсвязывающем домене (LBD), а другой – в ДНК-связывающем домене (DBD).

Создание библиотеки химических соединений. Флавоноиды – группа вторичных метаболитов, которые проявляют широкий спектр фармакологических активностей, таких как противомикробные, противовоспалительные, антивирусные, антинеопластические, антиатерогенные и др. [18]. В некоторых исследованиях показана способность флавоноидов ингибировать образование биопленок [19]. Исходя из этого, мы собрали библиотеку флавонов и их производных в качестве потенциальных соединений, способных ингибировать систему кворум-сенсинга *P. aeruginosa*, коррелирующую с образованием биопленок.

Чтобы создать библиотеку химических соединений, использовали базу данных PubChem [20], из которой методом Substructure отобрали 51675 флавонов и их производных. Далее на основании правила пяти Lipinski [21] мы исключили те соединения, для которых спрогнозирована плохая адсорбция или проникающая способность. В результате число соединений уменьшили до 21232. Вдобавок, чтобы удалить соединения, не имеющие химических производных, использован фильтр Chemical Vendors, что привело к сокращению числа соединений до 10532. Чтобы подготовить и оптимизировать лиганды, рассчитали конформационную подвижность (определение степеней свободы), добавили полярные атомы водорода и рассчитали заряды всех атомов. Структуры обработаны с использованием программного пакета OpenBabel v2.4.0 [22].

Молекулярный докинг осуществляли с использованием трех программных пакетов: AutoDock Vina [23], rDock [24] и LeDock [25], – которые показали высокую производительность в недавней комплексной оценке программ докинга [26].

Программы молекулярного докинга основаны на поиске конформации лиганда с минимальной энергией. При ранжировании возможных конформаций лиганда использовали аффинность связывания ΔG [27]. Последнюю рассчитывают на основе полной энергии межмолекулярных сил, включающих вандерваальсовы, электростатические, гидрофобные взаимодействия и водородные связи. Низкие значения ΔG соответствуют сильному, тогда как высокие – слабому связыванию лиганда [28].

На начальном этапе определяли пространственно-энергетические показатели взаимодействия исследуемых соединений с двумя активными центрами с использованием программного пакета AutoDock Vina [23]. При настройке, запуске и анализе симуляции использован бесплатный графический интерфейс AutoDock Tools [29]. С помощью этой программы осуществляли выбор двух боксов докинга, размеры которых не превышали 27000 Å^3, и далее использовали значение глубины поиска, равное 10, которое рекомендуют для быстрого виртуального скрининга малых боксов [30]. Результаты докинг-анализа 10 соединений, показавших самую высокую энергию связывания с обоими сайтами, приведены в табл. 1.

Важно отметить, что связывание нативного лиганда OdDHL с LBD происходит с энергией, равной –5.7 ккал. Полученные результаты свидетельствуют о том, что связывание выбранных соединений происходит интенсивно как с LBD, так и с DBD. Однако большинство химических соединений проявляло более высокую аффинность к LBD, поэтому дальнейшие исследования проводили именно с этим сайтом взаимодействия. Так как программы докинга несовершенны, для своих расчетов они используют упрощенные модели квантово-химических взаимодействий, а также менее ресурсозатратные алгоритмы, то для получения более достоверных результатов проведен молекулярный докинг тех же 10532 соединений другими программами докинга, а именно rDock [24] и LeDock [25]. Молекулярный докинг с помощью rDock [24] включает три основных шага: первый – определение системы, второй – генерация полости, третий – докинг. Во время докинга проводили 50 запусков для каждого лиганда, согласно рекомендации разработчиков rDock [24]. При проведении молекулярного докинга с помощью программы LeDock [25] генерацию входных файлов осуществляли по программе LePro [25].

В связи с использованием трех различных программ возникла необходимость обработки огромного количества информации по молекулярным докингам, поэтому мы разработали методику обработки данных.

Методика обработки данных. На первом этапе проводили нормализацию полученных результатов и создание общей оценочной системы. Поскольку разные программные пакеты рассчитывают энер-

Таблица 1. Результаты докинг-анализа соединений, показавших самую высокую энергию связывания с LBD и DBD LasR

№	PubChem CID	Аффинность связывания LBD, ккал/моль	PubChem CID	Аффинность связывания DBD, ккал/моль
1	108786995	−12.6	60617261	−10.9
2	108754324	−12.3	46684079	−10.5
3	108787038	−12.2	108773117	−10.2
4	108800047	−12.2	16297521	−10.2
5	1695677	−12.0	24335408	−10.1
6	108802999	−12.0	16505442	−10.0
7	108790351	−11.9	108773119	−10.0
8	108803145	−11.9	31836827	−10.0
9	108800021	−11.8	41418450	−10.0
10	108786994	−11.8	52655891	−9.9

Примечание. Здесь и в табл. 2: PubChem CID – идентификационный номер соединения в базе данных PubChem.

Таблица 2. Нормализованная оценка связывания с LBD LasR соединений, проявивших высокую аффинность по программам AutoDock Vina [23], rDock [24] и LeDock [25]

AutoDock		rDock		LeDock	
PubChem CID	Нормализованная оценка	PubChem CID	Нормализованная оценка	PubChem CID	Нормализованная оценка
108786995	100	16801690	100	24280119	100
108754324	96.04	2817219	98.74	53486694	97.52
108787038	94.72	18568736	95.66	16408601	97.68
108800047	94.72	82046503	95.45	6336429	97.26
1695677	92.08	25555952	94.66	108809778	96.84
108802999	92.08	93713806	94.57	396728	96.84
108790351	90.76	21000649	94.51	16408064	96.63
108803145	90.76	18568755	94.48	108787045	95.58
108800021	89.44	93713804	93.28	5449792	95.37
108786994	89.44	108811376	92.98	16407858	94.95

гию взаимодействия в разных единицах, то возникла необходимость перевода их в единую оценочную систему, где 100 единиц получает соединение, имеющее максимальную величину энергии взаимодействия, а 1 – соединение с минимальной энергией. Энергию взаимодействия всех соединений для каждой программы переводили в общую оценочную систему. В табл. 2 представлены нормализованные оценки связывания с LBD LasR 10 соединений из первоначального списка, включающего 10532 наименований.

Вторым шагом осуществляли суммирование нормализованных оценок, полученных тремя программами для каждого химического соединения. Затем, третьим шагом, проводили ранжирование соединений по их суммарной оценке, в результате чего наверху списка оказались соединения, получившие хорошую предсказательную оценку тремя программами (табл. 3). Таким образом, у тех соединений, которые получали ложные положительные результаты одной программой, понижался ранг в списке. Не исключено при этом, что все три программы предскажут ложные положительные или отрицательные результаты, но вероятность этого крайне мала, так как каждая из этих программ использует своеобразные методы предсказания. В свою очередь, вероятность ложного предсказания программами мала по сравнению с вероятностью истинного предсказания. Поскольку цель виртуального скрининга – поиск компромисса между долей действительно активных соединений в верхней части списка и их общим числом в списке, мы считаем использование этого подхода вполне обоснованным.

Таблица 3. Соединения, получившие хорошие оценки всеми программами

Соединение по IUPAC-номенклатуре	PubChem	AutoDock	rDock	LeDock	Sum
N-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4-(6,8-dimethyl-4-oxochromen-2-yl)benzamide	108786995	100	81.12	72.46	253.59
N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl]-2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-chromen-7-yl)oxyacetamide	16408424	68.32	86.34	92.85	247.52
N-(3-acetamidophenyl)-2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenyl-chromen-7-yl)oxyacetamide	16407791	70.96	86.03	88.64	245.64
4-(6-methyl-4-oxochromen-2-yl)-N-[5-(2-methylpropyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl]benzamide	108803142	85.48	76.67	82.34	244.50
4-(6-methyl-4-oxochromen-2-yl)-N-[2-(4-sulfamoylphenyl)ethyl]benzamide	108790338	78.88	85.36	85.36	243.01
2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxy-N-(2-oxochromen-6-yl)acetamide	16408830	65.68	83.23	92.01	240.92
(2S)-2-[[2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxy-acetyl]amino]-3-(1H-indol-3-yl)propanoic acid	29147486	73.6	78.45	88.22	240.28
3-[[[4-(6,8-dimethyl-4-oxochromen-2-yl)benzoyl]amino]methyl]benzoic acid	108800059	88.12	71.76	79.61	239.49
2-(5-hydroxy-4-oxo-2-phenylchromen-7-yl)oxy-N-(pyridin-3-ylmethyl)acetamide	16408601	67.0	74.34	97.68	239.03
N'-(4-fluorophenyl)-N-[4-(6-methoxy-4-oxochromen-2-yl)phenyl]butanediamide	108754330	81.52	85.79	70.57	237.89

Чтобы автоматизировать весь процесс обработки данных, написали скрипт. Схема работы алгоритма представлена на рис. 2.

Анализ сходства с лекарственными препаратами. Расчет физико-химических дескрипторов, а также предсказание параметров ADMET (абсорбции (Absorption), распределения по тканям (Distribution), метаболизма (Metabolism), выделений из организма (Excretion) и токсичности (Toxicity)) проводили с помощью трех различных программ, в частности SwissADME [31], admetSAR [32] и PASS online [33], которые удачно используют при открытии лекарств. Прогноз токсичности, проведенный в PASS online, включает в себя оценку вероятности наличия (Pa) и отсутствия каждой активности (Pi) со значениями в диапазоне от 0 до 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исходной библиотеке мы отобрали 10 соединений, которые получили высокие оценки по результатам трех программ (**рис. S1**, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Абелян_rus.pdf).

В структуре нативного лиганда (OdDHL) есть амидная связь [–CO–NH–], ответственная за связывание с Asp73 и Tyr56 LBD LasR. Такая же химическая связь присутствует в некоторых уже известных соединениях, взаимодействующих с LasR [34–37]. Примечательно, что во всех 10 выявленных нами соединениях присутствовала амидная связь. Это может говорить о сопоставимости

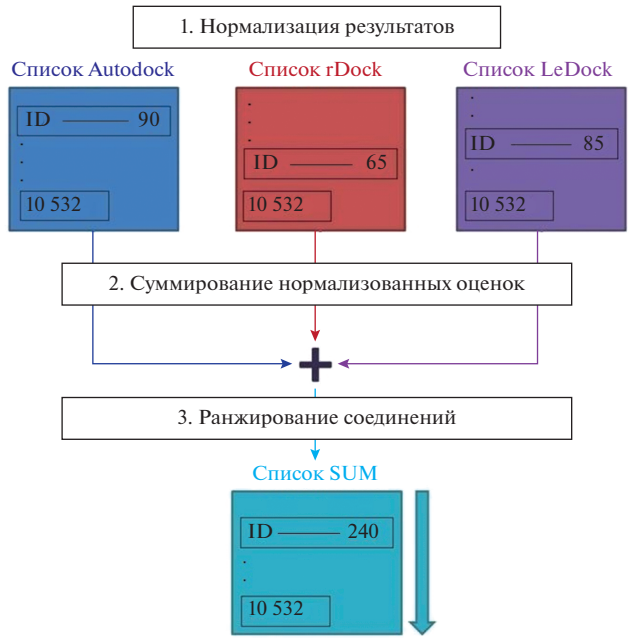

Рис. 2. Схема работы алгоритма, ID – идентификационный номер соединения, напротив – значение нормализованной оценки.

полученных результатов и важности этой связи в структуре соединений, обеспечивающих сильное взаимодействие с LBD LasR.

Выявленные нами лидирующие соединения имеют некоторое структурное сходство с соединениями, для которых уже выявлен ингибирующий эффект системы LasR/LasI.

Из 10 соединений, содержащих амидную связь, в семи встречается бензамидная группа. В трех из них бензольное кольцо связано с атомом азота аминогруппы (CID 16407791, CID 16408830, CID 108754330) а в четырех – с углеродом карбонильной группы (CID 108786995, CID 108803142, CID 108790338, CID 108800059). Из бензамидов CID 108786995 получил максимальную оценку по результатам трех программ (табл. 3, рис. 3). Согласно некоторым экспериментальным данным, соединения, содержащие бензамидную группу, обладали анти-вирулентными свойствами в *in vitro*/*in vivo* моделях. В работе [38] выявлено соединение с бензамидной группой – нифуроксазид, которое оказывало ингибирующее действие на систему QS, с непосредственным ингибированием регулятора транскрипции белка LasR. В работе [37] обнаружены трифенилмиметики OdDHL, взаимодействующие с LasR, которые также содержали бензамидную группу. В работе [36] в результате скрининга найден ряд соединений, содержащих бензамидную группу с выраженными анти-вирулентными свойствами. Эти соединения снижали продукцию HAQ, которая продуцируется системой PqsR. Наиболее мощные ингибиторы (M51, M34, M62, M50 и M64) не ингибировали белки, участвующие в непосредственном синтезе HAQ (экспрессируемые генами *pqsABCD*), что позволяет предположить, что эти ингибиторы нацелены на MvfR или другой восходящий регуляторный компонент. Показано, что соединение M64 взаимодействует с MvfR, что может привести к снижению продукции HAQ. Однако следует отметить, что снижение продукции HAQ и активация каскада системы PqsR (MvfR) происходит также через систему LasI/LasR. И поскольку в большинстве выявленных нами потенциальных кандидатов, ингибирующих LasR, есть бензамидная группа, то можно предположить, что для остальных соединений снижение продукции HAQ также обусловлено именно ингибированием системы LasR/LasI. Согласно статье [38], выявленные 3 анти-вирулентные соединения, включая нифуроксазид, кроме непосредственного ингибирования LasR, обладали также прямым ингибирующим действием на системы кворум-сенсинга Rhl и PqsR.

CID29147486 содержит бензол, связанный с пирролом (индол). Такая же химическая структура встречается и у индол HSL – соединения, которое ингибирует белок LasR [39].

CID 108800059 содержит бензойную кислоту, которая входит в состав салициловой кислоты и также обладает ингибирующим действием на LasR [38].

CID 16408830 содержит кумариновую группу (Coumarin(1,2-Benzopyrone)). Согласно исследованиям, кумарин обладает антибиопленочной активностью против патогена человека *P. aeruginosa* [40].

Конформационный анализ

Проведен конформационный анализ с визуализацией программой LigPlot+ для 10 наилучших соединений, входящих в ранжированный список [44]. Он показал, что некоторые из отобранных нами соединений связываются с теми же аминокислотами LBD, что и нативный лиганд. На основании кристаллографических данных установлено, что лактон OdDHL образует водородные связи с Asp73, Trp60, Tyr56, Ser129 [34] кармана LBD (рис. 4). Это может указывать на возможность конкурентного взаимодействия этих соединений. Следует отметить, что также обнаружены лиганды, которые могут прочно связываться с другими консервативными аминокислотами с образованием водородных связей или за счет ван-дер-ваальсовых сил и электростатических взаимодействий (рис. S2–S4, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Абелян_rus.pdf).

Анализ конформаций, полученных с использованием AutoDock Vina [23], показал, что соединения CID 29147486, 16408424, 16407791, 108790338, 108803142, 108786995 и 108800059 образуют водородные связи с LBD LasR. Из упомянутых соединений только соединения CID 108790338, 108803142, 108786995, 108800059 формируют водородную связь с консервативным аминокислотным остатком Tyr64 LBD LasR, тогда как CID 29147486 – с полуконсервативным Ala50 (табл. 4).

Анализ конформаций, установленных с помощью молекулярного докинга rDock [24], показал, что CID 16407791, 16408424, 16408830, 108754330, 108786995, 108790338, 108800059 образуют водородные связи с LBD LasR, соединения CID 108754330, 108786995, 108800059 – с консервативным аминокислотным остатком Trp60, тогда как CID 108786995, 108790338, 108800059 – с Tyr64 и CID 108754330 – с Arg61.

Результаты анализа конформаций докинга LeDock [25] свидетельствуют об образовании водородных связей с LBD LasR CID 29147486, 16408424, 16408601, 16408830, 108754330, 108786995, 108790338, 108800059, 16407791. Среди указанных соединений CID 108800059 образует водородные связи с консервативным Asp73, а CID 108786995 – с Tyr64.

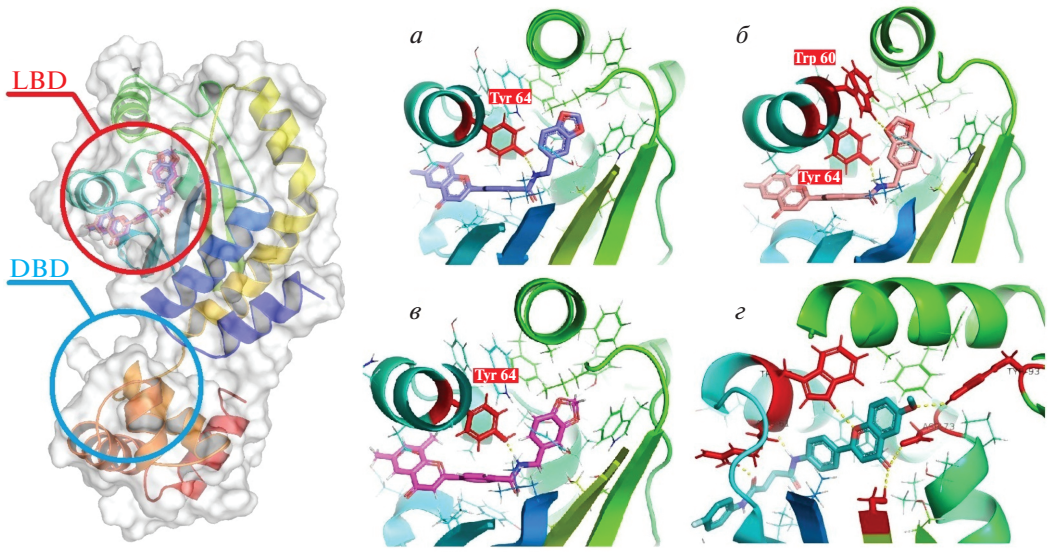

Рис. 3. Взаимодействие CID 108786995 с LasR LBD: *а* – конформация лиганда, предсказанная программой AutoDock; *б* – конформация лиганда, предсказания rDock; *в* – конформация лиганда, предсказания LeDock; *г* – связывание CID 108754330 с LBD LasR, предсказания rDock. При визуализации результатов использовали программы MarvinSketch [41], PyMOL [42] и VMD [43].

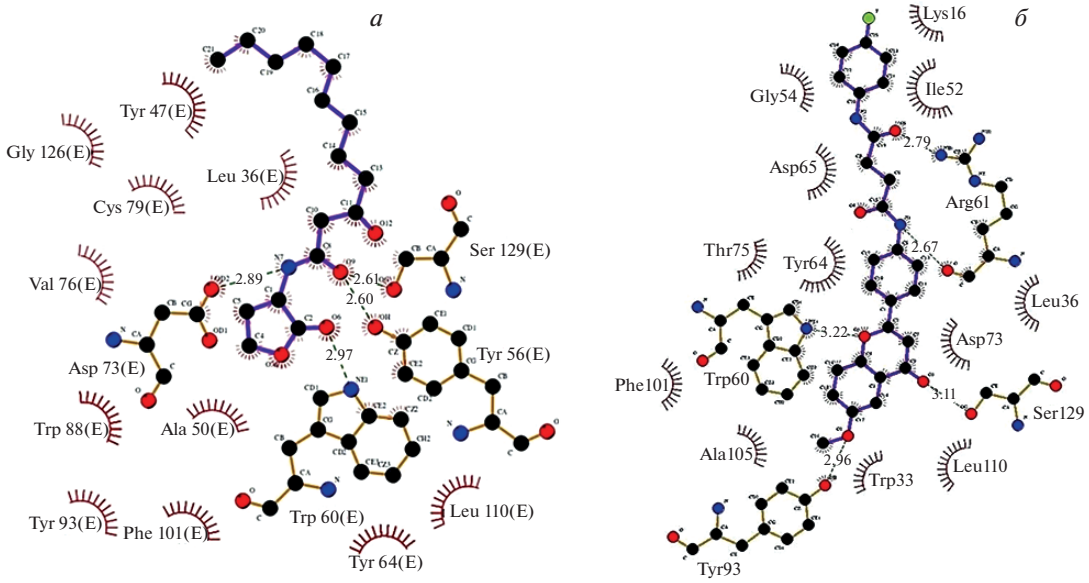

Рис. 4. Кристаллографическая структура нативного лиганда OdDHL с LBD LasR (*а*); связывание CID 108754330 с LBD LasR, предсказанное rDock (*б*).

Анализ сходства с лекарственными препаратами

По расчетным параметрам соединение CID 108786995 обладало потенциальными свойствами для использования в качестве лекарственного средства в биологических системах (рис. S5, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2020/1/supp_Абелян_rus.pdf). В admetSAR [32] предсказана высокая вероятность адсорбции желудочно-кишечным трактом (HIA+) и проникновения через гематоэнцефалический барьер (BBB+). По программе SwissADME [31] также предсказана активность HIA+, но не установлена BBB–. Прогноз токсичности выполнен с использованием PASS онлайн [33]. Согласно прогнозируемым результатам CID 108786995 не токсичен. Первые десять соединений, входящие в список, удовлетворяют критериям сходства с лекарственными средствами, как и CID 108786995, поэтому они заслуживают дальнейшего изучения как в тестах *in vitro*, так и в экспериментах *in vivo*.

Таблица 4. Взаимодействие лигандов с аминокислотами сайта связывания LBD LasR

		Ala127	Ala70	Ala50	Ser129	Arg71	Arg61	Tyr93	Tyr47	Tyr64	Asp65	Asp73	Asp46	Gly54	Trp60
AutoDock	29147486	X		X					X		X				
	16408424	X	X												
	16407791	X	X						X						
	108790338									X					
	108803142									X					
	108786995									X					
	108800059									X					
rDock	108754330				X		X	X							X
	16407791	X	X			X									
	16408830					X					X				
	108786995									X					X
	108790338				X					X					
	108800059									X					X
LeDock	29147486	X							X		X				
	16408424	X													
	16408601		X		X										
	16408830	X			X										
	108754330								X						
	108786995									X					
	108790338		X											X	
	108800059											X			
	16407791										X				

Примечание. Желтые столбцы (Tyr64, Asp73, Trp60) соответствуют высококонсервативным аминокислотам, зеленые (Ala50, Arg61) – полуконсервативным.

ВЫВОДЫ

Большинство флавонов и их производных можно рассматривать как потенциальные антибактериальные лекарственные соединения, которые взаимодействуют с LBD LasR с более высокой аффинностью связывания, чем с DBD. Среди выбранных на основании конформационного анализа соединений обнаружено, что существуют такие, которые связываются с теми же аминокислотами LBD, что и нативный лиганд. Это может указывать на возможность их конкурентного взаимодействия. Выявлен также ряд соединений, которые связываются с другими консервативными аминокислотами LBD и представляют интерес для дальнейшего изучения. Результаты виртуального скрининга согласуются с экспериментальными данными, которые показывают высокую антибактериальную активность бензамидов [35–37]. Сравнивая имеющиеся литературные данные, можно предположить, что бензамидсодержащие соединения способны ингибировать различные пути регуляторной сети системы QS. Таким образом, идентифицированные нами соединения могут потенциально ингибировать одновременно две системы QS. Выбранные соединения соответствуют критериям, необходимым для их рассмотрения в качестве лекарственных средств, и могут служить основой для проведения дальнейших

экспериментов *in vitro*/*in vivo* при разработке современной противоинфекционной терапии на основе системы кворум-сенсинга *P. aeruginosa*.

Мы благодарны за финансовую поддержку Министерству образования и науки Республики Армения (грант 10-2/I-1).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hampton T. (2013) Report reveals scope of US antibiotic resistance threat. *JAMA*. **310**, 1661–1663. https://doi.org/10.1001/jama.2013.280695
2. Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavaleri M., Cox E.M., Houchens CR., Grayson M.L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N. (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3
3. Lee J., Zhang L. (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. **6**, 26–41. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x
4. Pérez-Pérez M., Jorge P., Pérez Rodríguez G., Pereira M.O., Lourenço A. (2017) Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: new insights through network mining. *Biofouling*. **33**, 128–142. https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1272104
5. Williams P., Cámara M. (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 182–191. https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005
6. Rutherford S.T., Bassler B.L. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. **2**. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427
7. Moré M.I., Finger L.D., Stryker J.L., Fuqua C., Eberhard A., Winans S.C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science*. **272**, 1655–1658. https://doi.org/10.1126/science.272.5268.1655
8. Parsek M.R., Val D.L., Hanzelka B.L., Cronan J.E., Greenberg E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 4360–4365. https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4360
9. Ochsner U.A., Fiechter A., Reiser J. (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlAB genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem*. **269**, 19787–19795.
10. Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 1490–1494. https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1490
11. McGrath S., Wade D.S., Pesci E.C. (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol. Lett.* **230**, 27–34. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00849-8
12. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 39. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039
13. Jensen P.Ø., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T.B., Calum H., Christoffersen L., Moser C., Williams P., Pressler T., Givskov M., Høiby N. (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **153**, 1329–1338. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0
14. Allen L., Dockrell D.H., Pattery T., Lee D.G., Cornelis P., Hellewell P.G., Whyte M.K. (2005) Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J. Immunol.* **174**, 3643–3649. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3643
15. Bylund J., Burgess L.A., Cescutti P., Ernst R.K., Speert D.P. (2006) Exopolysaccharides from Burkholderia cenocepacia inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **281**, 2526–2532. https://doi.org/10.1074/jbc.M510692200
16. Grabski H., Hunanyan L., Tiratsuyan S., Vardapetyan H. (2019) Interaction of N-3-oxododecanoyl homoserine lactone with transcriptional regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*: Insights from molecular docking and dynamics simulations. *F1000Research*. **8**, 324. https://doi.org/10.12688/f1000research.18435.1
17. Huang B. (2009) MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. *Omics*. **13**, 325–330. https://doi.org/10.1089/omi.2009.0045
18. Kumar S., Pandey A.K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* 2013, **162750**. https://doi.org/10.1155/2013/162750
19. Paczkowski J.E., Mukherjee S., McCready A.R., Cong J.P., Aquino C.J., Kim H., Henkel B.R., Smith Ch.D., Bassler B.L. (2017) Flavonoids suppress *Pseudomonas aeruginosa* virulence through allosteric inhibition of quorum-sensing receptors. *J. Biol. Chem.* **292**, 4064–4076. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.770552
20. Pawson A.J., Sharman J.L., Benson H.E., Faccenda E., Alexander S.P., Buneman O.P., Davenport A.P., McGrath J.C., Peters J.A., Southan Ch., Spedding M., Yu W., Harmar A.J., NC-IUPHAR. (2014) The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledgebase of drug targets and their

ligands. *Nucleic Acids Res.* **42**, D1098–106. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1143

21. Lipinski C.A. (2004) Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **1**, 337–341. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007
22. O'Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. (2011) Open Babel: an open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **3**, 33. https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33
23. Trott O., Olson A.J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461. https://doi.org/10.1002/jcc.21334
24. Li L., Chen R., Weng Z. (2003) RDOCK: refinement of rigid-body protein docking predictions. *Proteins.* **53**, 693–707. https://doi.org/10.1002/prot.10460
25. Kolb P., Huang D., Dey F., Caflisch A. (2008) Discovery of kinase inhibitors by high-throughput docking and scoring based on a transferable linear interaction energy model. *J. Med. Chem.* **51**, 1179–1188. https://doi.org/10.1021/jm070654j
26. Wang Z., Sun H., Yao X., Li D., Xu L., Li Y., Tian Sh., Hou T. (2016) Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 12964–12975. https://doi.org/10.1039/c6cp01555g
27. Pagadala N.S., Syed K., Tuszynski J. (2017) Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* **9**, 91–102. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1
28. Jacob R.B., Andersen T., McDougal O.M. (2012) Accessible high-throughput virtual screening molecular docking software for students and educators. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002499. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002499
29. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **30**, 2785–2791. https://doi.org/10.1002/jcc.21256
30. Jaghoori M.M., Bleijlevens B., Olabarriaga S.D. (2016) 1001 Ways to run AutoDock Vina for virtual screening. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **30**, 237–249. https://doi.org/10.1007/s10822-016-9900-9
31. Daina A., Michielin O., Zoete V. (2017) SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **7**, 42717. https://doi.org/10.1038/srep42717
32. Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Lee P.W., Tang Y. (2012) admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.* **52**, 3099–3105. https://doi.org/10.1021/ci300367a
33. Filimonov D.A., Lagunin A.A., Gloriozova T.A., Rudik A.V., Druzhilovskii D.S., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2014) Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. *Chem. Heterocycl. Comp.* **50**, 444–457. https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1
34. Müh U., Hare B.J., Duerkop B.A., Schuster M., Hanzelka B.L., Heim R., Olson E.R., Greenberg E.P. (2006) A structurally unrelated mimic of a *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 16948–16952. https://doi.org/10.1073/pnas.0608348103
35. O'Loughlin C.T., Miller L.C., Siryaporn A., Drescher K., Semmelhack M.F., Bassler B.L. (2013) A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 17981–17986. https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110
36. Smith K.M., Bu Y., Suga H. (2003) Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chem. Biol.* **10**, 81–89. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(03)00002-4
37. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhaya A., Lesic B., He J., Kitao T., Righi V., Milot S., Tzika A., Rahme L. (2014) Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLoS Pathogens.* **10**, e1004321. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004321
38. Yang L., Rybtke M.T., Jakobsen T.H., Hentzer M., Bjarnsholt T., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2009) Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2432–2443. https://doi.org/10.1128/AAC.01283-08
39. Geske G.D., Wezeman R.J., Siegel A.P., Blackwell H.E. (2005) Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12762–12763. https://doi.org/10.1021/ja0530321
40. D'Almeida R.E., Molina R.D.I., Viola C.M., Luciardi M.C., Nieto Peñalver C., Bardón A., Arena M.E. (2017) Comparison of seven structurally related coumarins on the inhibition of Quorum sensing of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*. *Bioorg. Chem.* **73**, 37–42. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.05.011
41. Csizmadia F. (2000) JChem: Java applets and modules supporting chemical database handling from web browsers. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **40**, 323–324. https://doi.org/10.1021/ci9902696
42. Yuan S., Chan H.C.S., Hu Z. (2017) Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Comput. Mol. Sci.* **7**, e1298. https://doi.org/10.1002/wcms.1298
43. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–8, 27. https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5
44. Laskowski R.A., Swindells M.B. (2011) LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Mod.* **51**, 2778–2786. https://doi.org/10.1021/ci200227u

In silico SCREENING OF FLAVONES AND ITS DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF QUORUM SENSING REGULATOR LasR OF *Pseudomonas aeruginosa*

N. Abelyan[1, *], H. Grabski[1], and S. Tiratsuyan[1, 2]

[1]*Institute of Biomedicine and Pharmacy, Russian-Armenian University, Yerevan, 0051 Armenia*

[2]*Faculty of Biology, Yerevan State University, Yerevan, 0025 Armenia*

**e-mail: narek.abelyan@rau.am*

Antibiotic resistance is a global problem nowadays and in 2017 the World Health Organization published the list of bacteria for which treatment are urgently needed, where *Pseudomonas aeruginosa* is of critical priority. Current therapies lack efficacy because this organism creates biofilms conferring increased resistance to antibiotics and host immune responses. The strategy is to "not kill, but disarm" the pathogen and resistance will be developed slowly. It has been shown that LasI/LasR system is the main component of the quorum sensing system in *P. aeruginosa*. LasR is activated by the interaction with its native autoinducer. A lot flavones and their derivatives are used as antibacterial drug compounds. The purpose is to search compounds that will inhibit LasR. This leads to the inhibition of the synthesis of virulence factors thus the bacteria will be vulnerable and not virulent. We performed virtual screening using AutoDock Vina, rDock, LeDock for obtaining consensus predictions. The results of virtual screening suggest benzamides which are synthetical derivatives of flavones as potential inhibitors of transcriptional regulator LasR. These are consistent with recently published experimental data, which demonstrate the high antibacterial activity of benzamides. The compounds interact with the ligand binding domain of LasR with higher binding affinity than with DNA binding domain. Among the selected compounds, by conformational analysis, it was found that there are compounds that bind to the same amino acids of ligand binding domain as the native autoinducer. This could indicate the possibility of competitive interaction of these compounds. A number of compounds that bind to other conservative amino acids ligand binding domain have also been discovered, which will be of interest for further study. Selected compounds meet the criteria necessary for their consideration as drugs and can serve as a basis for conducting further *in vitro/in vivo* experiments. It could be used for the development of modern anti-infective therapy based on the quorum sensing system of *P. aeruginosa*.

Keywords: antibiotic resistance, *Pseudomonas aeruginosa*, quorum sensing, LasR, benzamide, virtual screening, flavone, molecular docking