

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Кривицкая Александра Вячеславовна

**Молекулярное моделирование механизмов ферментативных
реакций, связанных с бактериальной резистентностью к
 β -лактамным антибиотикам**

Специальность 1.5.8 – Математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена в группе молекулярного моделирования института биохимии им. А. Н. Баха «Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель — *Хренова Мария Григорьевна, доктор физико-математических наук, проф. РАН*

Официальные оппоненты — *Шайтан Алексей Константинович, доктор физико-математических наук, чл.-кор. РАН, кафедра биоинженерии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова, профессор*

Щекотихин Андрей Егорович, доктор химических наук, профессор, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе", директор, зав. лабораторией химической трансформации антибиотиков

Полынская Юлия Геннадьевна, кандидат физико-математических наук, отдел материаловедения ООО "Кинтех Лаб", научный сотрудник

Защита диссертации состоится «20» июня 2024 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М. В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3013>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук



Фурсова П.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

На сегодняшний день устойчивость бактерий к противомикробным препаратам является одной из самых актуальных проблем человечества. Устойчивость к противомикробным препаратам является причиной более 700 тысяч смертельных случаев в мире ежегодно и к 2050 году число смертей может вырасти до 10 миллионов. Больше половины врачебных назначений антибиотиков приходится на β -лактамы. β -лактамные антибиотики встраиваются в активный центр пенициллин-связывающих белков. Время жизни образующегося устойчивого комплекса достаточно для того, чтобы прекратить рост бактериальной стенки. Таким образом, β -лактамы препятствуют образованию пептидных мостиков и объединению пептидогликанов в единую структуру, вследствие чего бактерия погибает. Однако бактерии выработали механизмы устойчивости к β -лактамным антибиотикам.

К механизмам резистентности к β -лактамным антибиотикам можно отнести четыре следующих процесса: продукция ферментов β -лактамаз, изменение мишеней β -лактамных антибиотиков, изменение работы эффлюксных насосов и поринов. Различают сериновые и металло- β -лактамазы в зависимости от состава активного центра. Эти ферменты расщепляют β -лактамное кольцо в антибиотике, делая молекулу неспособной ингибировать синтез клеточной стенки. Модификации пенициллин-связывающих белков могут быть направлены на ухудшение связывания с антибиотиками или, если реакция все-таки произошла, на ускорение реакции деацилирования ацил-фермента, уменьшая тем самым время его существования, что приводит к восстановлению функции пенициллин-связывающих белков. Эффлюксные насосы выводят антибиотики изнутри клетки, снижая их концентрацию и соответственно эффективность, а порины отвечают за проницаемость β -лактамов в клетку. Резистентность к антибиотикам – комплексное явление и может комбинироваться из всех или нескольких механизмов резистентности одновременно. Однако наибольший вклад в резистентность к β -лактамным антибиотикам вносят продукция β -лактамаз и модификации пенициллин-связывающих белков. Данные механизмы резистентности активно изучаются в настоящее время, однако экспериментальные работы в данной области не позволяют оценить молекулярный механизм инактивации β -лактамных антибиотиков в активных центрах ферментов. В то время как детальная информация о

механизмах реакции может быть полезна для поиска новых антибактериальных средств. Необходимую для этого детальную информацию возможно получить методами молекулярного моделирования и квантовой химии.

В поиске новых лекарственных препаратов компьютерными методами задействованы такие подходы как докинг, моделирование и картирование фармакофоров, построение взаимосвязи структура-свойство или структура-активность, виртуальный скрининг на основе последовательностей и так далее. Большая часть экспериментальных данных, подходящих для сравнительного анализа в прогнозах связывания *in silico*, генерируется в фармацевтической промышленности и сохраняется конфиденциальной, а не публикуется для общего использования. Информация из академических источников зачастую ограничивается прогнозом лекарственного соединения без его проверки на практике. Известные случаи поиска лекарственных препаратов компьютерными методами с последующей проверкой в открытом доступе показывают не высокие результаты. Это отчасти может быть связано с тем, что в большинстве методов для оценки связывания используются оценочные функции, основанные на классических силовых полях молекулярной механики. Точность прогноза можно увеличить с помощью проведения квантово-химических расчетов. То есть перейти от рассмотрения молекулярной системы на уровне атомов до совокупности электронов и ядер. Анализ электронной плотности, полученной из квантово-химических расчетов, позволяет более детально охарактеризовать исследуемую систему. Однако квантово-химические расчеты очень трудоемки. В связи с чем исследователи сталкиваются с дилеммой: анализ сотни тысяч соединений с зачастую неэффективными прогнозами или более точные оценки взаимодействий для небольшого набора молекул.

Также известно, что больше половины выводимых на рынок лекарственных средств на 2023 год – это аналоги уже известных и используемых лекарств. Такие аналоги называют «следующий в классе», их поиск не обязательно подразумевает анализ сотен тысяч соединений. Для поиска «следующих в классе» используется небольшой набор молекул, в связи с чем возможно применение подхода, основанного на анализе электронной плотности, полученной из квантово-химических расчетов. В данном подходе строится уравнение, связывающее макросвойства системы, взятые из эксперимента, и микросвойства системы, описывающие особенности распределения электронной плотности.

В данной работе рассматриваются два механизма устойчивости к β -лактамам антибиотикам: гидролиз β -лактамовых антибиотиков металло- β -лактамазами и появление аминокислотных замен в пенициллин-связывающем белке 2 (PBP2) из *Neisseria Gonorrhoeae*, которые ухудшают их ингибирование антибиотиком цефтриаксоном. Также в работе обсуждается поиск новых антибактериальных препаратов, основанный на анализе электронной плотности активного центра фермента.

Степень разработанности проблемы

Механизмы инактивации β -лактамовых антибиотиков активно изучаются структурными, кинетическими и спектральными методами, однако их детализация недостаточна для определения последовательности всех элементарных стадий и их энергетических характеристик. Среди вопросов, требующих дополнительных исследований методами молекулярного моделирования можно выделить следующие. Для реакции гидролиза карбапенемов считается, что состав продуктов зависит от конкретной структуры карбапенема и типа металло- β -лактамазы. При этом состав продуктов, определенный методами ЯМР и РСА, для реакции инактивации имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 различается. Известно, что рост резистентности в ряду PBP2 из *Neisseria Gonorrhoeae* связан с появлением определенных аминокислотных замен, но нет данных, указывающих как именно эти мутации влияют на механизм реакции в активном центре фермента. В литературе представлены единичные работы по поиску новых антибактериальных средств на основе квантово-химического анализа электронной плотности активных центров ферментов.

Цели и задачи

Целью работы является определение молекулярных механизмов инактивации β -лактамовых антибиотиков в активных центрах пенициллин-связывающих белков и металло- β -лактамаз и поиск новых антибактериальных препаратов методами квантовой химии и молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Расчет профиля энергии Гиббса реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами квантовой механики/молекулярной механики с описанием квантовой подсистемы различными гибридными функционалами теории функционала электронной плотности.

2. Сравнение механизмов реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1.
3. Определение влияния аминокислотных замен на механизм реакции ингибирования цефтриаксоном пенициллин-связывающих белков 2 из разных штаммов *Neisseria Gonorrhoeae*.
4. Определение взаимосвязи между электронно-плотностными характеристиками активного центра и скоростью реакции гидролиза цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1.
5. Определение взаимосвязи между электронно-плотностными характеристиками активного центра и значениями IC50 ингибиторов NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот.

Научная новизна

В данной работе методом молекулярной динамики с комбинированными потенциалами квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) установлены молекулярные механизмы антибиотикорезистентности ферментов, критически важных для формирования бактериальной стенки. Определены механизмы инактивации антибиотиков ферментами, действие которых является превалирующим механизмом бактериальной резистентности. Дескрипторы электронной плотности позволили оценить особенности формирования фермент-субстратных комплексов и выделить факторы, влияющие на эффективность рассмотренных лекарственных препаратов. Уравнения, связывающие экспериментальные макросвойства системы и микросвойства системы из расчета можно использовать для поиска новых антибактериальных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе установлены механизмы инактивации карбапенемов металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 и молекулярные механизмы, связанные с ростом резистентности в ряду PBP2 из *Neisseria Gonorrhoeae*, теоретические знания о которых ранее не были представлены. Предложены уравнения, определяющие взаимосвязь рассчитываемых микроскопических параметров и экспериментально наблюдаемых свойств системы, для прогнозирования новых соединений: медленно гидролизующихся β -лактамных антибиотиков и более эффективных ингибиторов класса органических бороновых кислот металло- β -лактамазы NDM-1. Полученные уравнения можно использовать для поиска новых антибактериальных препаратов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием методов молекулярного моделирования, включая метод молекулярной динамики, метод направленной молекулярной динамики, гибридный метод КМ/ММ. Энергетические профили химических реакций описывались методом КМ/ММ с описанием квантово-механической подсистемы методом функционала электронной плотности. Для построения профилей энергии Гиббса использовался метод зонтичной выборки, для конформационного анализа – динамический сетевой анализ. Анализ электронной плотности проводился в рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах.

Положения, выносимые на защиту:

1. При сравнении гибридных функционалов с различными долями точного обмена Хартри-Фока для описания механизма реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ показано, что только функционал PBE0-D3 правильно определяет лимитирующую стадию и описывает накопление интермедиата реакции.
2. Петля L10 в металло- β -лактамазах NDM-1 и L1 определяет жесткость активного центра, как следствие, эффективность нуклеофильной атаки и состав продуктов ферментативной реакции: в L1 единственный продукт реакции енамин, в NDM-1 основной продукт реакции енамин, но ввиду более гибкого активного центра возможно образование (S)-имина. Для обеих систем (R)-имин образуется после выхода продуктов в раствор в результате таутомеризации.
3. Аминокислотная замена Gly545Ser в PBP2 мутантных штаммов изменяет положение цефтриаксона в активном центре, в связи с чем наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_s определяется не только увеличением константы диссоциации K_s , но и уменьшением константы скорости ацилирования k_2 .
4. Взаимосвязь между параметрами электронной плотности водородной связи $N_{S...H}$ в структуре переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1 и наблюдаемым макроскопическим параметром k_{cat} можно использовать для прогнозирования скорости реакции гидролиза новых соединений цефалоспоринового ряда.
5. Реакция нуклеофильной атаки ингибиторов на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот каталитическим гидроксид анионом происходит безбарьерно в результате

связывания в активном центре фермента, однако IC50, согласно установленной взаимосвязи, обладают величинами не ниже 30 мкМ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Сформулированные в тексте работы положения, выводы и практические рекомендации основаны на расчетах с использованием современных методов описания электронной структуры и молекулярного моделирования, результаты продемонстрированы в приведенных таблицах и рисунках.

Материалы работы были представлены на семинарах лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования химического факультета МГУ и следующих конференциях: международная конференция «Математика. Компьютер. Образование», 2018-2023 гг.; ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ «Биохимическая физика», Москва, 2018, 2022 гг.; ежегодная отчетная конференция аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 2020-2023 гг.; симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» Москва, 2021 г.; зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2023, 2024 гг.; школа-конференция для молодых ученых «Суперпатогены - новый цивилизационный вызов», Сочи, 2022 г.; VII Съезд биофизиков России, Краснодар, 2023 г.; саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.БИОТЕХ», Сочи, 2023 г.; международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения», Суздаль, 2023 г.; I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», Казань, 2023 г.

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science и RSCI.

Структура и объем

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 225 наименований. Работа содержит 39 рисунков и 4 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении дано обоснование актуальности, теоретической и практической значимости работы, сформулированы цели, задачи и положения, выносимые на защиту.

Литературный обзор

В литературном обзоре представлены классификация β -лактамовых антибиотиков, механизм их действия на бактериальные стенки бактерий с описанием строения бактериальных стенок. Описаны известные механизмы резистентности к β -лактамовым антибиотикам, история появления резистентности и современное состояние. Представлены классы β -лактамаз с современными вариантами механизмов инактивации β -лактамовых антибиотиков и истории поиска ингибиторов β -лактамаз.

Материалы и методы

В главе «Материалы и методы» представлен обзор используемых в работе методов. Описаны основы метода молекулярной динамики с классическими и комбинированными потенциалами КМ/ММ и методы анализа молекулярных траекторий. Представлен обзор методов квантовой химии с постановкой задачи о подборе подходящего гибридного функционала. Анализ электронной плотности проводился в рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах. Описаны способы построения сечений поверхности потенциальной энергии и энергии Гиббса элементарных стадий реакции. Изложены основы метода зонтичной выборки, используемого для построения профилей энергии Гиббса и динамического сетевого анализа для конформационного анализа. Также представлена детализация проведенных расчетов.

Результаты и их обсуждение

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из пяти разделов, соответствующих пяти поставленным задачам.

Выбор оптимального метода расчета механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1

В данном разделе произведен выбор оптимального метода расчета механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1. Проведены молекулярно-динамические расчеты фермент-субстратных комплексов для оценки распределений геометрических параметров и методом зонтичной выборки рассчитаны профили энергии Гиббса элементарных стадий, квантовые части описаны методом теории функционала

электронной плотности с гибридными функционалами, отличающимися вкладом точного хартри-фоковского обмена: V3LYP-D3 (20%), PBE0-D3 (25%) и BHHLYP-D3 (50%).

В активном центре фермент-субстратного комплекса оксианионный центр формируется за счет двух координационных связей: $d(\text{Zn}1^{2+}\dots\text{O})$ поляризует карбонильную группу $\text{C}=\text{O}$, а $d(\text{Zn}2^{2+}\dots\text{N})$ поляризует связь $\text{C}-\text{N}$ β -лактамного кольца – в результате происходит активация субстрата ферментом. Молекулярно-динамические расчеты с КМ/ММ потенциалами показали, что в случае расчета BHHLYP-D3 расстояния между ионами цинков и β -лактамным кольцом слишком велики (рисунок 1) и характеризуют структуру как чрезмерно рыхлую. Для функционала BHHLYP-D3 больше половины всех структур имеют значения нуклеофильной атаки в диапазоне 3,0 – 3,6 Å. На таких расстояниях нуклеофильная атака не может происходить с низкими энергетическими барьерами. Распределения расстояний нуклеофильной атаки для V3LYP-D3 и PBE0-D3 смещены в диапазон с меньшими значениями и составляют $2,74 \pm 0,14$ Å и $2,75 \pm 0,17$ Å соответственно.

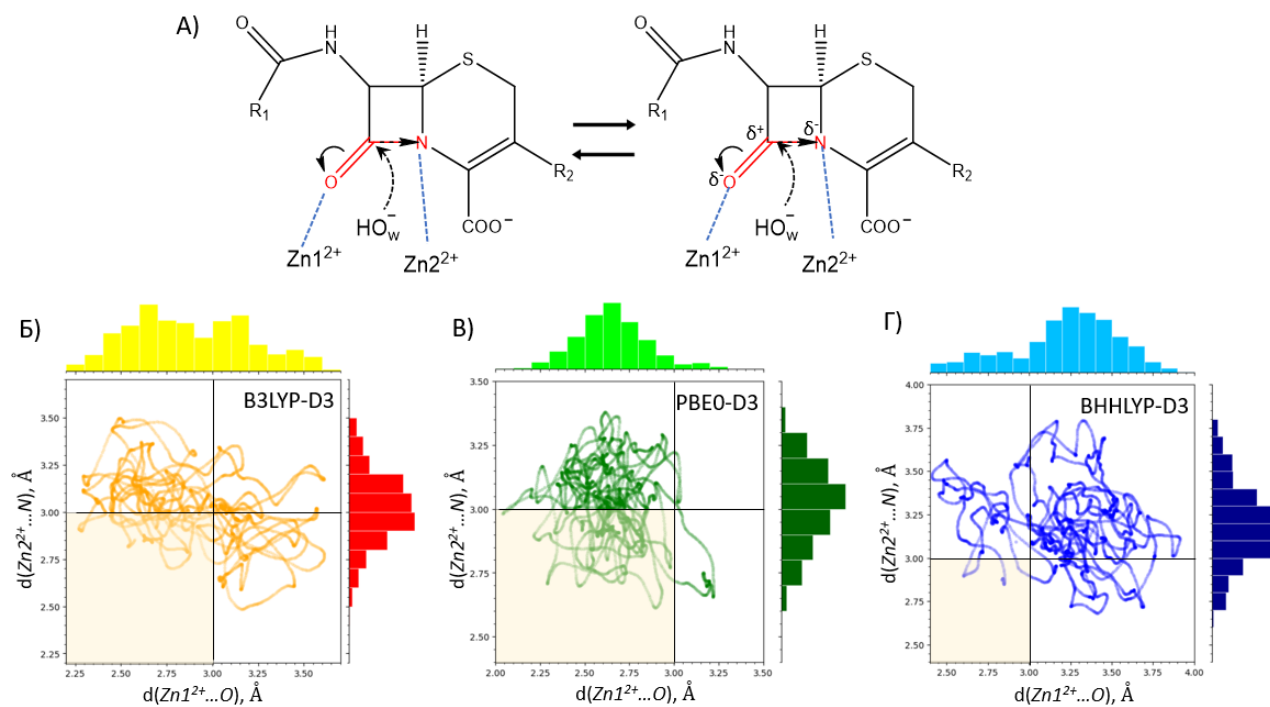


Рисунок 1. Схема активации субстрата ферментом в активных центрах металло-β-лактамаз (А), распределение длин координационных связей $d(\text{Zn}1^{2+}\dots\text{O})$ и $d(\text{Zn}2^{2+}\dots\text{N})$ в активном центре фермент-субстратного комплекса L1 металло-β-лактамазы с нитроцефином из КМ/ММ МД траекторий, рассчитанных с функционалами V3LYP-D3 (Б), PBE0-D3 (В), BHHLYP-D3 (Г) в КМ подсистеме. Желтым квадратом выделена область структур, активированных обеими координационными связями

Проведена оценка реакционности частиц в фермент-субстратном комплексе электронно-плотными дескриптором – лапласианом электронной плотности.

Отрицательный лапласиан электронной плотности указывает на нуклеофильную природу рассматриваемой области, а положительный лапласиан электронной плотности указывает на наличие электрофильной области. Все ферменты, рассмотренные в данной работе, относятся к классу гидролаз и реакции в их активных центрах начинаются с нуклеофильной атаки кислорода на карбонильный углерод. Анализируя 2D-карты лапласиана электронной плотности на атоме углерода на линии нуклеофильной атаки, наблюдается зазор, когда частица является реакционной. Подобный анализ показал, что для PBE0-D3 и B3LYP-D3 доля реакционных структур согласуется с наблюдениями о геометрических характеристиках оксианионного центра. Для BHHLYP-D3 анализ карт лапласиана электронной плотности показал активацию субстрата во всех структурах при нереалистичных значениях расстояний в активном центре. Следовательно, BHHLYP-D3 не позволяет дискриминировать активированные и неактивированные состояния.

Рассчитанные профили энергии Гиббса реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 представлены на рисунке 2.

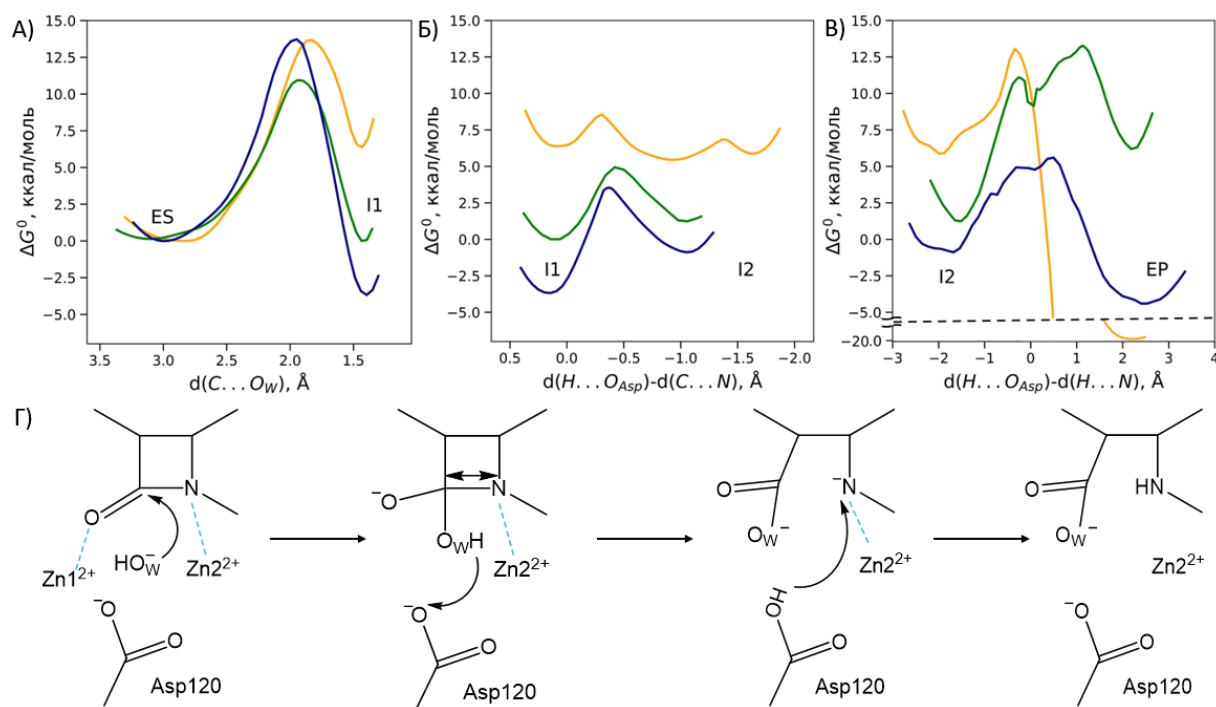


Рисунок 2. Энергетические профили элементарных стадий реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1, полученные методами PBE0-D3 (зеленым), B3LYP-D3 (желтым), BHHLYP-D3 (синим); ES – фермент-субстратный комплекс, I1 – первый интермедиат реакции, I2 – второй интермедиат реакции, EP – продукт реакции (A-B), схема механизма реакции (Г)

На первой стадии реакции происходит нуклеофильная атака гидроксид-аниона на углерод карбонильного фрагмента β -лактамного кольца. Вторая стадия реакции заключается в разрыве β -лактамного кольца и переносе протона с кислорода гидроксид-

аниона на каталитический остаток Asp120. На третьей стадии реакции происходит перенос атома водорода с остатка Asp120 на атом азота β -лактамного кольца через кислород O_w с сопутствующим разрывом координационной связи между азотом и цинком. Согласно экспериментальным данным, взятым из литературы: 1) на профиле энергии второй интермедиат должен быть либо стабилизирован, либо сопоставим с фермент-субстратным комплексом; 2) третья стадия реакции является лимитирующей стадией всей реакции – ее рассчитанный энергетический барьер должен быть выше остальных энергетических барьеров. Единственным функционалом, удовлетворяющим этим двум критериям, оказался PBE0-D3, он выбран для дальнейших расчетов.

Сравнение механизмов реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1

В процессе гидролиза карбапенемов в активном центре металло- β -лактамаз образуется интермедиат реакции с делокализованным фрагментом $(C_2-C_3-N)^-$, далее в ходе реакции происходит протонирование этого фрагмента. В литературе имеются расхождения относительно продукта реакции гидролиза антибиотика карбапенемового ряда имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1: разные исследовательские группы наблюдают в результате реакции разные энантиомеры C_2 -протонированного имипенема.

Анализ активного центра фермент-субстратных комплексов L1 и NDM-1 с имипенемом показал, что аминокислотный состав петли L10 влияет на гибкость активного центра и путь реакции в NDM-1 и L1. Формирование более жесткого активного центра в L1 приводит к более эффективной активации имипенема. В более жестком активном центре L1 наблюдаются более узкие распределения расстояний нуклеофильной атаки и координационных связей, формирующих оксианионный центр (рисунок 3).

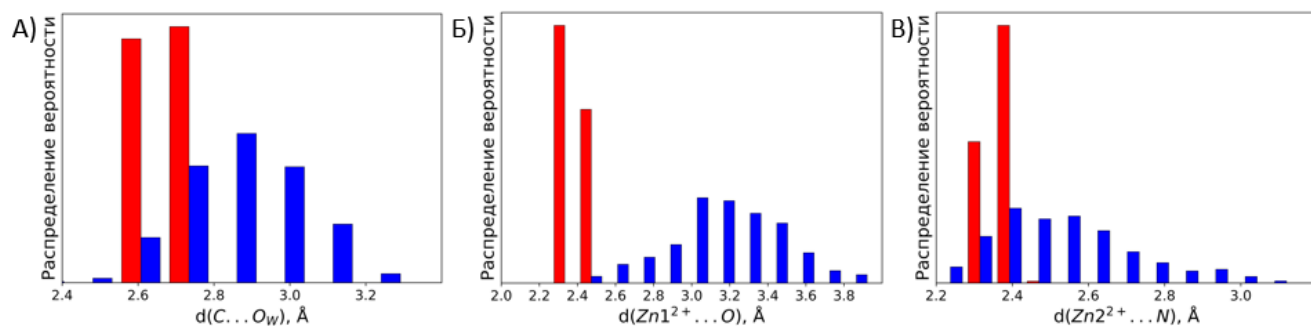


Рисунок 3. Распределения межатомных расстояний в L1 (красный) и NDM-1 (синий): А) расстояние нуклеофильной атаки, $d(C...O_w)$, Б) координационная связь между катионом цинка и атомом кислорода карбонильной группы субстрата, $d(Zn1^{2+}...O)$, В) длина координационной связи между катионом цинка и атомом азота β -лактамного кольца, $d(Zn2^{2+}...N)$

Такая разница в активации субстрата отражается в анализе реакционности структур фермент-субстратного комплекса электронно-плотными характеристиками – лапласианом электронной плотности и индексами электрофильности Фукуи: доля реакционных структур в L1 составляет 100%, в то время как для NDM-1 – 90%; средние значение величины атомных индексов электрофильности Фукуи на карбонильном атоме углерода имипенема также выше для L1. Как следствие, более эффективная активация субстрата в L1 приводит к более низкому энергетическому барьеру и большей стабилизации интермедиата первой стадии реакции (рисунок 4).

Показано, что енаминная форма имипенема образуется как основной продукт в активном центре NDM-1 и как единственный продукт в активном центре L1. В NDM-1 ввиду строения фермента в активный центр попадает вода, что обуславливает существование альтернативного пути реакции, который приводит к образованию (S)-имина. Этот процесс происходит с более высокими энергетическими барьерами.

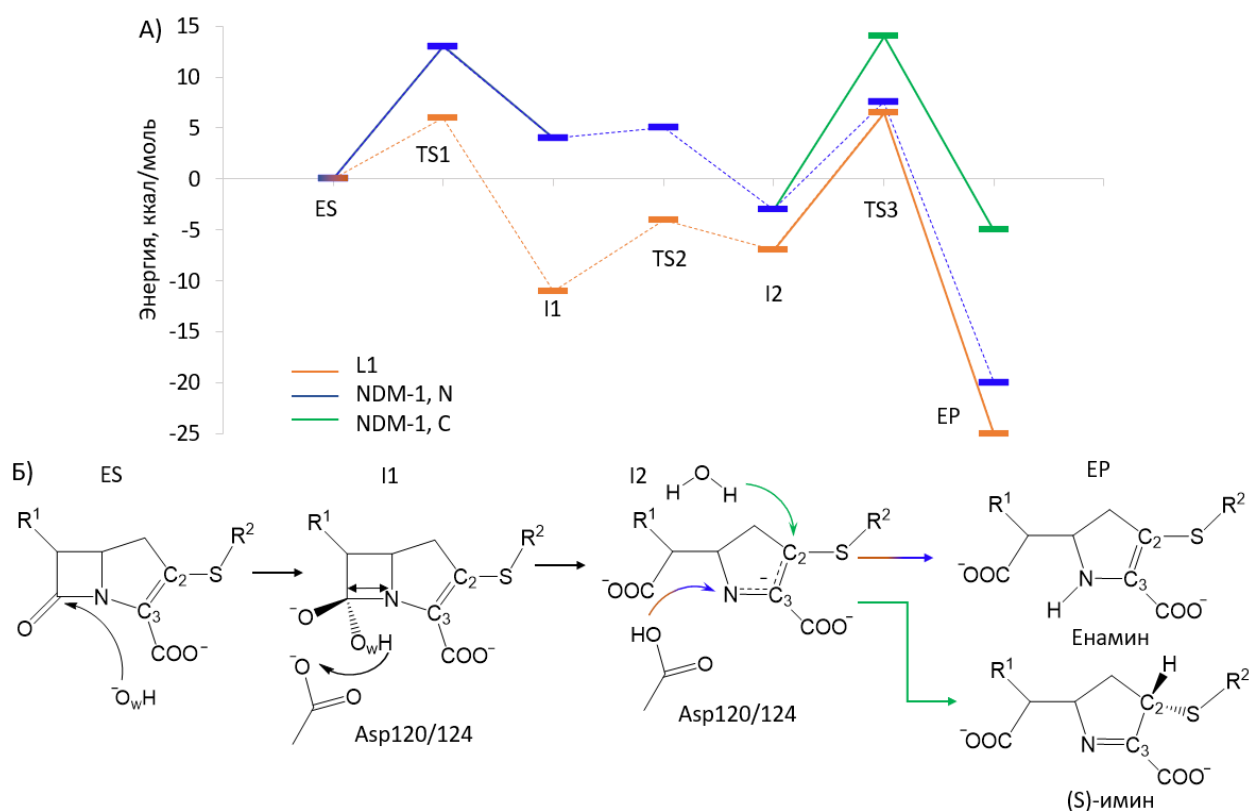


Рисунок 4. Энергетические профили реакции гидролиза имипенема металло-β-лактамазами: в активном центре NDM-1 с образованием N-продукта – синяя линия, в активном центре NDM-1 с образованием C-продукта – зеленая линия, в активном центре L1 – оранжевая линия

Однако в эксперименте наблюдались только иминные формы имипенема. Следовательно, после выхода енамина из активного центра фермента, происходит его таутомеризация. Для изучения механизма таутомеризации в растворе проведены расчёты

методом классической молекулярной динамики анионного интермедиата имипенема и енамина. Далее по геометрическим критериям набор структур был разделен на конформации способствующие образованию (S)-имина, (R)-имина и открытую конформацию, в которой возможно образование и той, и другой формы. Критериями распознавания конформаций и отнесения их к одному из трех типов служили торсионный угол, показывающий положение заместителя при атоме C₂ имипенема относительно плоскости пирролинового кольца, - C₄C₂SC₁₀, и расстояние между атомом, принимающим протон, C₂, и концевыми атомами заместителя – N₂, C₁₁, N₃ (рисунок 5 А, В). Анализ траекторий для енамина показал, что 62% конформаций являются предпочтительными для таутомеризации в (R)-имин, 28% в (S)-имин и 10% соответствуют открытым конформациям, из которых возможна таутомеризация в оба энантиомера (рисунок 5 Б).

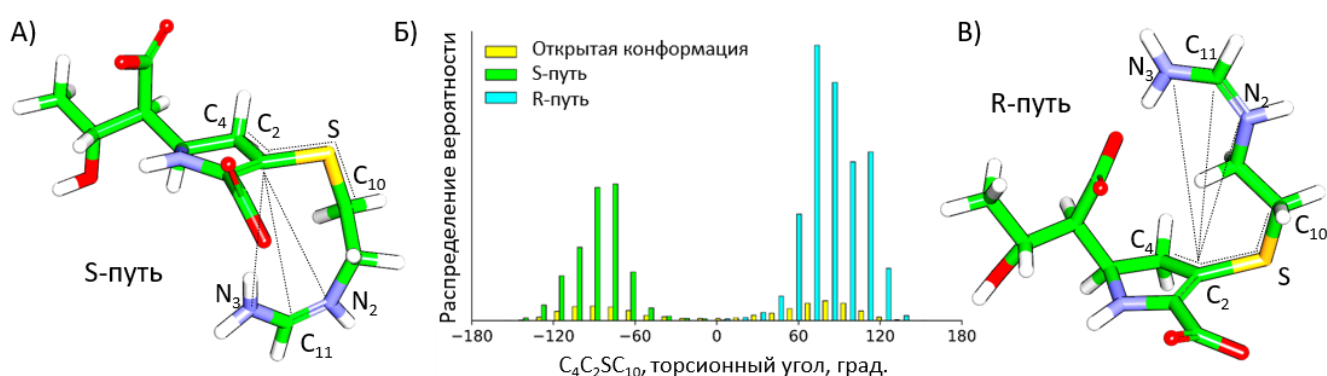


Рисунок 5. Енамин в конформации, предпочтительной для таутомеризации в (S)-имин (А) и в (R)-имин (В). Пунктирными черными линиями показаны геометрические критерии для разделения конформаций. Б) Распределение вероятности структур предпочтительных для протонирования в S положение (зеленым), R положение (бирюзовым), оба положения (желтым)

Аналогичный анализ для динамики интермедиата (C₂-C₃-N)⁻ показал, что 86% конформаций являются предпочтительными для таутомеризации в (R)-имин, 9% в (S)-имин и 5% соответствуют открытым конформациям. Однако в данном случае продукт реакции определяется во многом локализацией отрицательного заряда во фрагменте (C₂-C₃-N)⁻: в структуре енаминной формы протонирование на N и иминной формы на атом C₂. Для определения изомерной формы в растворе было проведено моделирование молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами, затем для 50 кадров из траектории рассчитывались порядки связи по Лапласиану. Было показано, что для структур R- и S-пути наблюдается исключительно иминная форма. Для открытых конформаций характерны обе резонансные формы.

Таким образом, в ферментативной реакции в активном центре металло-β-лактамаз L1 и NDM-1 преимущественно происходит образование продукта гидролиза имипенема,

протонированного по атому азота. Таутомеризация в (R)-имин происходит уже после выхода продукта в раствор. Данные расчётов согласуются с результатами литературных экспериментальных исследований по УФ-видимой и ЯМР спектроскопии с временным разрешением, имеющихся в литературе.

Сравнение механизмов ингибирования антибиотиком цефтриаксоном ряда RBP2 из *Neisseria Gonorrhoeae*

RBP2 из *Neisseria Gonorrhoeae* являются критически важными ферментами в формировании клеточной стенки бактерий. Известны случаи резистентности RBP2 к антибиотику цефтриаксону, который является последней линией защиты от гонореи. Штамм дикого типа этой бактерии FA19 хорошо поддается терапии, а мутантные штаммы 35/02 и H041 проявляют устойчивость к действию антибиотиков. Из литературных экспериментальных данных известен эффективный каталитический параметр k_2/K_S , который демонстрирует, что эффективность ингибирования падает в 150 раз и 2300 раз для RBP2^{35/02} и RBP2^{H041} по сравнению с RBP2^{FA19} соответственно. Рост резистентности связывают со снижением сродства RBP2 к цефтриаксону за счет ограничения подвижности петли β_3 - β_4 , в то время как данные по мутагенезу показывают, что за резистентность в большей степени ответственны мутации, большая часть которых располагаются вблизи активного центра, а не петли β_3 - β_4 : Ile312Met, Val316Thr и Gly545Ser в 35/02; Ala311Val, Val316Pro, Thr483Ser в H041.

Анализ активного центра RBP2 показал, что положение субстрата в RBP2 из мутантных штаммов существенно отличается от такового в FA19, что связано преимущественно с мутацией Gly545Ser. В FA19 субстрат находится глубоко в каталитическом кармане, в мутантных штаммах субстрат не заходит так глубоко в каталитический карман, так как Ser545 связывается с консервативной карбоксильной группой цефтриаксона (рисунок 6 А). В рамках анализа фермент-субстратного комплекса RBP2 с цефтриаксоном были рассчитаны молекулярно-динамические траектории с КМ/ММ потенциалами. Распределение значений расстояния нуклеофильной атаки для комплекса с белком дикого типа значительно короче (рисунок 6 В). В исследуемых фермент-субстратных комплексах оксианионный центр формируется за счет образования водородных связей между карбонильным кислородом антибиотика и атомами водорода NH групп основных цепей Ser310 и Thr500 (рисунок 6 Б). Распределение длин водородной связи между NH группой основной цепи Thr500, d(O...H_T), и карбонильным

кислородом остается практически одинаковым для всех рассматриваемых систем. Распределение длин водородной связи между NH группой основной цепи Ser310, $d(O...H_s)$, и карбонильным кислородом смещается в сторону больших значений с ростом резистентности (рисунок 6 Г).

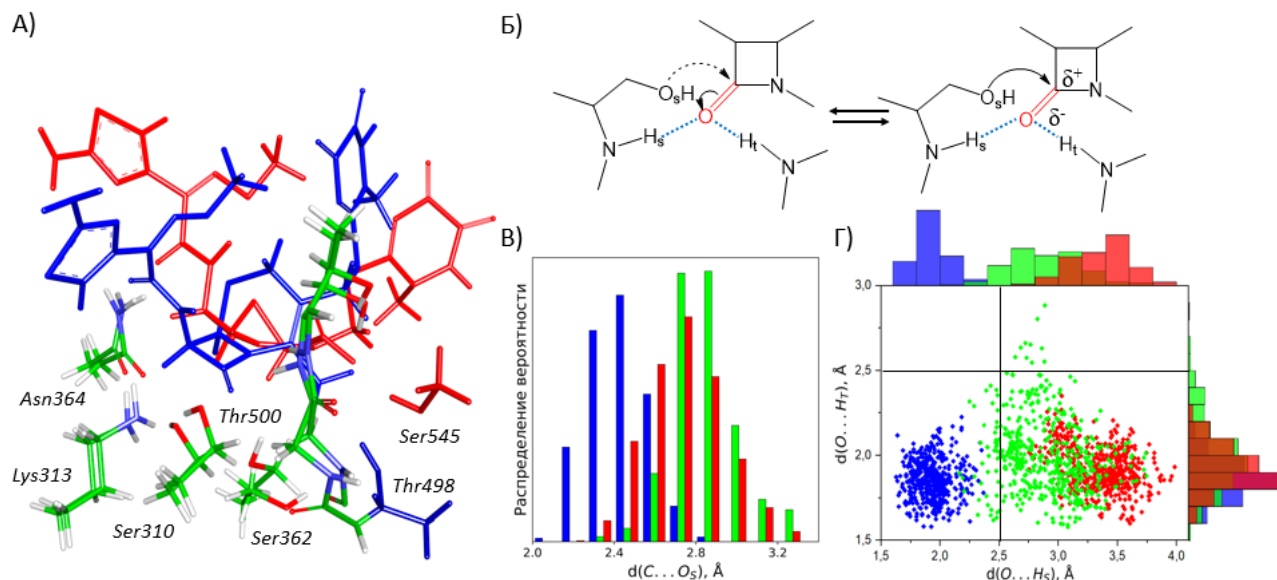


Рисунок 6. А) Наложение структур, связанных с цефтриаксоном активных центров RBP2^{FA19} (синим) и RBP2^{H041} (красным). Выравнивание по атомам азота и углерода основных цепей Ser310, Lys313 и Thr500. Б) Схема активации субстрата ферментом в активных центрах RBP2. В) Распределение расстояний нуклеофильной атаки $d(C...O_s)$. Г) совместное распределение водородных связей $d(O...H_s)$ и $d(O...H_t)$ для RBP2^{FA19} (синим), мутантов RBP2^{35/02} (зеленым), RBP2^{H041} (красным)

Смещение цефтриаксона в активном центре мутантных форм RBP2 (рисунок 6 А) способствует ухудшению активации субстрата, что подтверждается в анализе эффекта активации картами лапласиана электронной плотности и расчетами индекса электрофильности Фукуи атома углерода карбонильного фрагмента цефтриаксона: с ростом резистентности доля реакционных структур снижается и индексы электрофильности для RBP2^{FA19} выше, чем для мутантов. Разница в эффекте активации отражается в величине энергетических барьеров первой стадии реакции: для RBP2^{FA19} – 4,6 ккал/моль, для RBP2^{35/02} – 8,4 ккал/моль и для RBP2^{H041} – 9,4 ккал/моль. Интермедиат реакции стабилизирован относительно фермент-субстратного комплекса в RBP2 из штамма дикого типа, в то время как в RBP2 из мутантных штаммов интермедиат дестабилизирован на 5 ккал/моль. Полученные энергетические барьеры возрастают с уменьшением активации субстрата и ростом резистентности (рисунок 7 и 8).

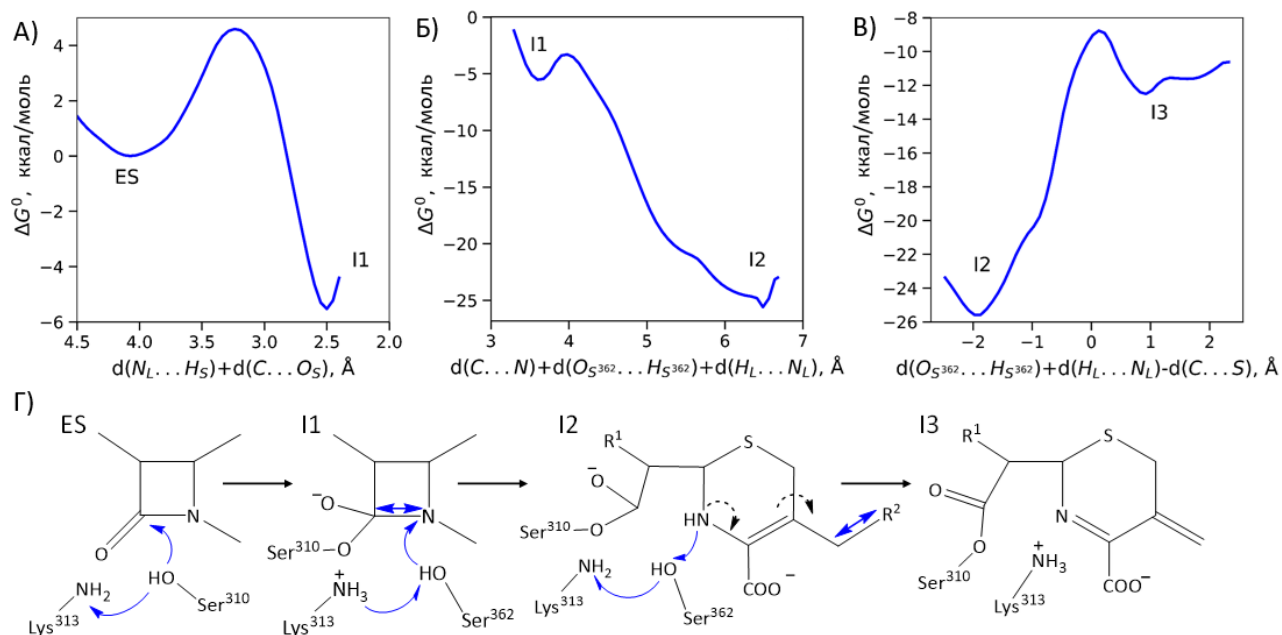


Рисунок 7. Профили энергии Гиббса (А-В) элементарных стадий реакции ацилирования в комплексе RBP2^{FA19}-цефтриаксон. Г) Схема механизма реакции; синие стрелки – координаты реакции; пунктирные черные стрелки показывают перераспределение электронных пар

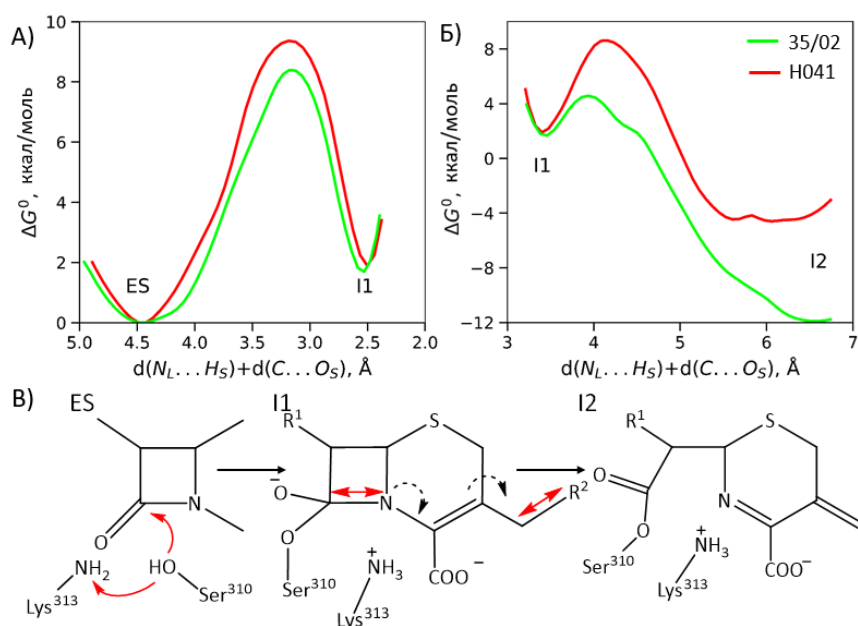


Рисунок 8. Профили энергии Гиббса (А-Б) элементарных стадий реакции ацилирования цефтриаксоном RBP2^{35/02} и RBP2^{H041}. В) Схема механизма реакции; красные стрелки – координаты реакции; пунктирные стрелки показывают перераспределение электронных пар

Установлено, что механизм реакции в мутантных RBP2 и из штамма дикого типа отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках (рисунок 7 и 8). Такая разница связана с тем, что цефтриаксон иным образом связывается с RBP2 из мутантных штаммов. Вследствие чего при разрыве C-N связи β-лактамного кольца в мутантных формах нет поблизости доноров протона, чтобы стабилизировать

этот интермедиат, что приводит к синхронному разрыву связи C-N β -лактамного кольца и отщеплению уходящей группы R² антибиотика.

Динамический сетевой анализ петли β_3 - β_4 в молекулярно-динамической траектории общей длиной 1 мкс, показал, что с ростом резистентности петля становится менее подвижной и плоской. Данные наблюдения согласуются с экспериментальными исследованиями.

Определение электронных факторов, влияющих на скорость гидролиза ряда цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1

Для построения уравнения связывающего экспериментальные константы скорости реакции и расчетные квантово-механические величины была выбрана хорошо изученная как экспериментально, так и теоретически реакция – гидролиз нитроцефина металло- β -лактамазой L1. Известно, что лимитирующей стадией данной реакции является протонирование интермедиата реакции – перенос протона с каталитического остатка Asp120 на атом N₅ антибиотика через атом кислорода от новообразованной карбоксильной группы с сопутствующим разрывом координационной связи. Поэтому для поиска антибактериальных препаратов, в первую очередь были рассмотрены расчетные энергетические барьеры данной стадии реакции для десяти антибиотиков цефалоспоринового ряда, k_{cat} которых находятся в пределах двух порядков. Вычисленные энергетические барьеры лимитирующей стадии и значения экспериментальных каталитических констант не коррелируют друг с другом. Это связано с тем, что погрешность даже в 1 ккал/моль на энергетической шкале соответствует ошибке определения константы скорости в 5-6 раз. В связи с чем для анализа активного центра фермента был применен подход квантово-топологической теории атомов в молекулах для состояний интермедиата реакции и переходного состояния лимитирующей стадии для десяти исследуемых антибиотиков. Межатомные взаимодействия характеризуют критические точки связи (КТС), далее они были выбраны для описания ключевых координационных и водородных связей в активном центре фермента. В каждой из КТС были рассчитаны дескрипторы электронной плотности. Монотонные зависимости получены только между дескрипторами электронной плотности в КТС на линии водородной связи N...N структуры переходного состояния и каталитическими константами реакции гидролиза (таблице 1). Для всех остальных рассматриваемых КТС в обеих структурах не было обнаружено никаких зависимостей от k_{cat}.

Таблица 1. Характеристики линейных зависимостей между дескрипторами электронной плотности в КТС на линии водородной связи N...N в геометрической конфигурации переходного состояния и экспериментальными значениями k_{cat} .

Дескриптор	Диапазон	R ²	Коэффициент наклона	Свободный член	Ошибка, с ⁻¹
d(N...N), Å	1,86 – 2,07	0,862	373 ± 53	-700 ± 103	202 – 213
$\rho(r)$, а.е.	0,028 – 0,037	0,861	-6291 ± 892	245 ± 30	55 – 63
$\nabla^2 \rho(r)$, а.е.	0,081 – 0,096	0,675	-2891 ± 710	291 ± 64	122 – 132
λ_1 , а.е.	-0,055 – (-0,032)	0,879	3524 ± 461	186 ± 20	35 – 45
λ_2 , а.е.	-0,025 – (-0,048)	0,795	3408 ± 613	154 ± 22	37 – 51
λ_3 , а.е.	0,140 – 0,190	0,835	-1166 ± 183	229 ± 31	57 – 66
E(НВ) _g , ккал/моль	5,6 – 7,8	0,788	-34,7 ± 6,4	260 ± 42	78 – 92
E(НВ) _v , ккал/моль	6,8 – 10,0	0,831	-24 ± 3,8	231 ± 32	58 – 70
ρ_{topo}	0,09 – 0,12	0,873	-2349 ± 317	287 ± 34	63 – 72
S _(КТС-1, O_w) , а.е.	0,0075 – 0,0140	0,741	-12370 ± 2583	169 ± 29	48 – 65
S _(КТС-1, N) , а.е.	-0,0045 – +0,0003	0,939	-15282 ± 1377	7,9 ± 3,2	3,2 – 9,4
S _(КТС-1, N) , %	-18,6 – +0,9	0,933	-3,8 ± 0,4	9,2 ± 3,3	3,7 – 10,7
S _(КТС-1, O_wH) , а.е.	0,0040 – 0,0096	0,821	-14257 ± 2354	128 ± 16	25 – 39
S _(КТС-1, O_H) , %	16,6 – 26,7	0,779	-7,6 ± 1,4	201 ± 32	55 – 60

Помимо характеристик электронной плотности, расстояния d(N...N) равновесных геометрических конфигураций также хорошо коррелируют с наблюдаемым k_{cat} (рисунок 10 А). Основным недостатком этого дескриптора является погрешность, которая более чем в два раза превышает разницу между наибольшим и наименьшим значениями k_{cat} .

Функция влияния учитывает характерные вклады атомов O_w, Н и N в электронную плотность в КТС на линии связи N...N. Как абсолютные, так и относительные значения атомных вкладов N в электронную плотность демонстрируют высокую корреляцию с каталитическими константами, R² = 0.939 (рисунок 10 Б). Данные зависимости имеют наименьшие погрешности из всех рассматриваемых дескрипторов 3,2 – 9,4 с⁻¹ и 3,7 – 10,7 с⁻¹ соответственно. Абсолютный вклад N в КТС был выбран для прогнозирования значений k_{cat} . Перед непосредственным прогнозированием новых антибиотиков, полученная зависимость (рисунок 10 Б) была валидирована на антибиотике с известным значением k_{cat} . Антибиотик цефалоспоринового ряда цефтазидим обладает экспериментальной k_{cat} = 15,4 с⁻¹, а предсказанное значение по предложенной модели составляет 15,7 ± 3,9 с⁻¹.

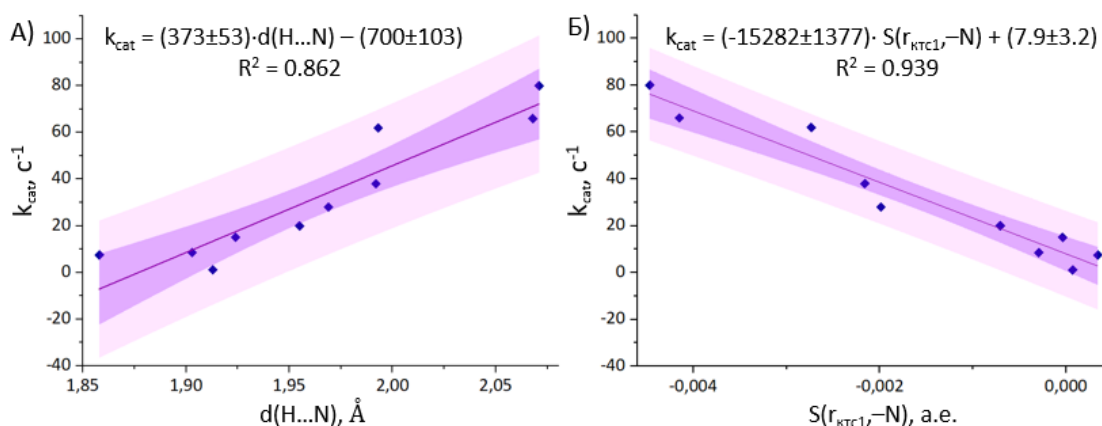


Рисунок 10. Линейные корреляции между каталитическими константами скорости k_{cat} и длиной водородной связи N...H (А), абсолютным вкладом N в электронную плотность КТС-1 (Б)

Затем был выбран самый медленно гидролизующийся антибиотик цефокситим и в нем проведены виртуальные модификации с целью поиска нового соединения с ещё меньшими значениями k_{cat} . Введение либо двух атомов фтора, либо двух метильных групп сильно изменило значения k_{cat} . Согласно предложенной в работе зависимости, значение k_{cat} для цефокситина- F_2 составляет $-0,3 \pm 3,9 \text{ с}^{-1}$. Указанная величина в коридоре погрешностей попадает в положительную область и принимает наименьшие значения среди рассмотренных вариантов.

Определение электронных факторов, влияющих на эффективность ингибиторов NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот

Для сравнения реакции NDM-1 с субстратом имипенемом и ингибитором, были рассчитаны энергетические профили стадии нуклеофильной атаки гидроксид анионом на атом углерода β -лактамного кольца в случае субстрата и атом бора в случае ингибитора. В качестве ингибитора было выбрано соединение *срд5* на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот (рисунок 12). Энергетические профили реакции представлены на рисунке 12 А и Б. Для субстрата энергетический барьер нуклеофильной атаки составляет около 14 ккал/моль, а П почти на 4 ккал/моль выше по энергии, чем комплекс ES. Ингибитор образует устойчивый тетраэдрический комплекс с NDM-1 безбарьерно.

Для анализа активации субстрата и ингибитора в активном центре NDM-1 были проанализированы молекулярно-динамические траектории имипенема и ингибитора в явном водном растворе и комплексов фермент-имипенем и фермент-ингибитор для сравнительного анализа. Для атомов углерода в имипенеме и бора в ингибиторе были рассчитаны индексы электрофильности Фукуи (рисунок 11 В и Г). Среднее значение индекса Фукуи для карбонильного углерода имипенема увеличивается более чем в два

раза по сравнению с водным раствором, что иллюстрирует эффект активации субстрата ферментом. Индекс электрофильности Фукуи на атоме бора в ферменте оказался меньше, чем в растворе. Что объясняется частичным заполнением р-орбитали бора электронами атома O_w . Это взаимодействие вместе с дальнедействующими электростатическими взаимодействиями между партнерами по координационным связям могут быть причиной невозможности локализации минимума, соответствующего предреакционному комплексу.

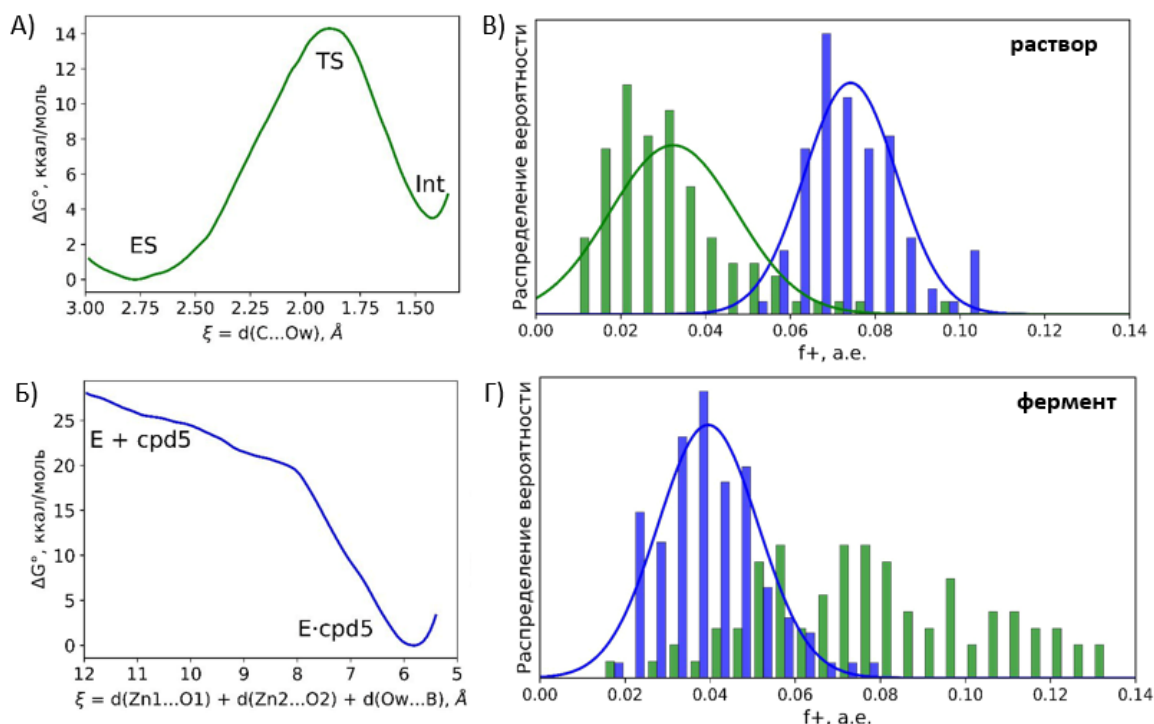


Рисунок 11. Профили энергии Гиббса для реакции нуклеофильной атаки гидроксид анионом имипенема (А) и ингибитора cpd5 (Б); распределение индексов электрофильности Фукуи, f^+ карбонильного углерода имипенема (зеленым) и атома бора ингибитора cpd5 (синим) в водном растворе (В) и в активном центре NDM-1 (Г)

Для данной задачи были рассмотрены дескрипторы электронной плотности в критических точках координационных связей между гидроксидборонатом и катионами цинка: $d(Zn1^{2+}...O_w)$, $d(Zn1^{2+}...O_1)$ и $d(Zn2^{2+}...O_2)$ существуют соответствующие КТС-1, КТС-2 и КТС-3. В качестве дескрипторов взаимодействия были выбраны электронная плотность, лапласиан электронной плотности и функция влияния, описывающая вклады атомов O_w , O_1 и O_2 в электронную плотность соответствующих КТС (рисунок 12 Б).

Наилучшие корреляции были получены для зависимости IC_{50} от атомных вкладов в КТС и сумм дескрипторов, рассчитанных в трех КТС. Эти уравнения в дальнейшем использовались для прогнозирования значений IC_{50} новых соединений (рисунок 12).

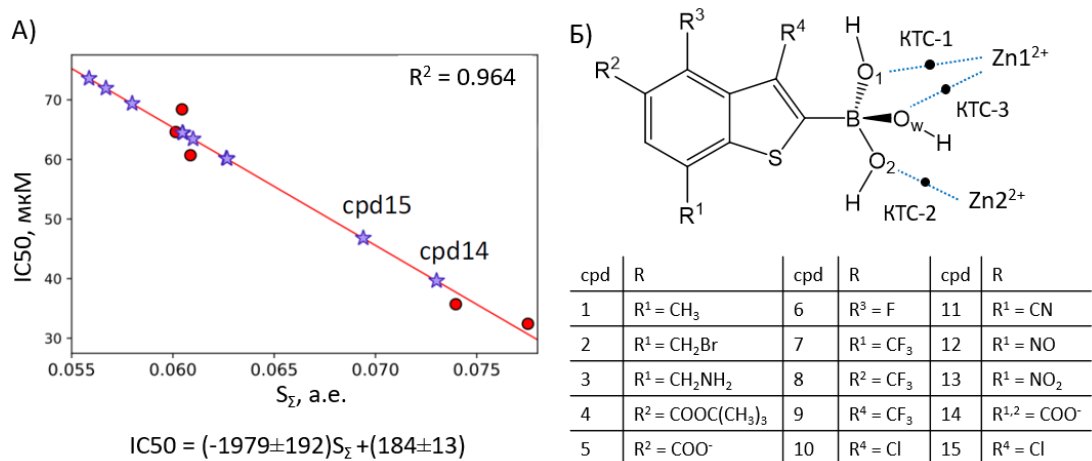


Рисунок 12. А) Зависимость между экспериментальными значениями IC₅₀ и расчетными значениями суммы атомных вкладов кислорода в КТС-1,2,3; Б) общая схема комплекса бороновых ингибиторов на основе бензо[*b*]тиофена с NDM-1

Ингибиторы cpd1-cpd5 взяты из экспериментальных литературных данных, cpd6-cpd10 из базы данных PubChem. Однако предсказанные значения IC₅₀ с данным набором оказались выше 60 мкМ. Поэтому далее в качестве ведущего соединения для разработки новых ингибиторов был взят ингибитор cpd5, который имеет самое низкое значение IC₅₀ среди исследованных экспериментально. Среди виртуально модифицированных cpd5 (cpd11-cpd15) наиболее перспективными являются cpd14 и cpd15, которые предсказали значения IC₅₀ 40 мкМ и 47 мкМ соответственно. Однако и эти значения являются большими, чем уже известные экспериментально.

Заключение

Моделирование динамического поведения фермент-субстратного комплекса металло-β-лактамазы L1 с нитроцефином с разными гибридными функционалами для описания КМ подсистемы показало, что функционал ВННLYP-D3, содержащий 50% вклада точного хартри-фоковского обмена, воспроизводит рыхлую геометрию комплекса и не позволяет дискриминировать активированные и неактивированные состояния. При описании механизма реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1 показано, что из рассматриваемых функционалов PBE0-D3 наилучшим образом согласуется с экспериментальными данными по лимитирующей стадии и накоплению интермедиата реакции. Поэтому далее в работе для описания КМ частей исследуемых комплексов использовался метод функционала электронной плотности в варианте PBE0-D3/6-31G**.

Исследование механизма инактивации антибиотика имипенема в активных центрах металло-β-лактамаз L1 и NDM-1 показало, что наблюдаемый в

экспериментальных исследованиях продукт гидролиза имипенема (R)-имин образуется не в активных центрах ферментов, а в результате таутомеризации из енамина в растворе. В активном центре L1 в ходе реакции гидролиза имипенема образуется енамин, в NDM-1 преобладающим продуктом является енамин, однако может происходить конкурирующая реакция с большей энергией активации, продуктом которой является (S)-имин. Также показано, что особенности протекания реакции в активных центрах данных ферментов определяются гибкостью активного центра.

Молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования PBP2 из штаммов FA19, 35/02, H041 цефтриаксоном показало, что изменение положения субстрата в активном центре фермента, вызванное аминокислотной заменой Gly545Ser, отражается на формировании оксианионного центра и, как следствие, на механизме реакции. Высота энергетических барьеров первой стадии реакции увеличивается с ростом резистентности вследствие ухудшения активации цефтриаксона. Механизм реакции в мутантных PBP2 и из штамма дикого типа отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках. Анализ конформационных изменений петли β_3 - β_4 , показал, с ростом резистентности петля становится менее подвижной и плоской.

При анализе структуры переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза ряда цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1, было определено, что взаимодействие N...N связано со скоростью реакции гидролиза. Анализ электронной плотности в критических точках связей показал наличие монотонных зависимостей между значениями дескрипторов электронной плотности и параметром стационарной кинетики k_{cat} . Установленная взаимосвязь между макроскопическим параметром, наблюдаемым в эксперименте, и параметрами электронной плотности взаимодействия N...N может использоваться для предсказания константы скорости реакции гидролиза новых соединений цефалоспоринового ряда металло- β -лактамазой L1 при поиске новых негидролизующих или медленно гидролизующих антибиотиков. В работе предложены модификации антибиотика цефокситина, способствующие снижению скорости его гидролиза.

Анализ связывания бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот с NDM-1 показал, что реакция нуклеофильной атаки гидроксид-аниона на атом бора бензо[b]тиофенового ингибитора происходит самопроизвольно в результате связывания в активном центре

фермента. Построено уравнение, связывающее экспериментальные параметры IC50 и параметры электронной плотности в критических точках связи, расположенных на линиях координационных связей атомов кислорода тетраэдрического бороната с ионами цинка в активном центре NDM-1. На основе полученного уравнения были предложены пять новых структур ингибиторов. Среди них наиболее перспективными являются cpd14 и cpd15, для которых рассчитанные значения составляют IC50 40 мкМ и 47 мкМ соответственно. Однако и эти значения являются большими, чем уже известные экспериментально. Можно заключить, что дальнейшего снижения значения IC50 можно добиться, изменив органическое ядро бороновой кислоты.

Выводы

1. При моделировании механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ наилучшее согласие с экспериментальными кинетическими данными наблюдается при описании квантовой подсистемы гибридным функционалом PBE0-D3.
2. В реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 образуется енамин, который после выхода в раствор таутомеризуется в (R)-имин, наблюдаемый в эксперименте. В активном центре NDM-1 в качестве побочного продукта образуется (S)-имин, что обусловлено разным аминокислотным составом петли L10 металло- β -лактамаз L1 и NDM-1.
3. Аминокислотная замена Gly545Ser в PBP2 мутантных штаммов ухудшает связывание цефтриаксона, увеличивая константу диссоциации K_S , и ослабляет активацию субстрата, понижая константу скорости ацилирования k_2 , что объясняет наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_S .
4. Определена взаимосвязь между наблюдаемым параметром k_{cat} и рассчитываемыми дескрипторами электронной плотности, характеризующими водородную связь N...N в структурах переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза цефалоспоринов металло- β -лактамазой L1, что можно использовать для оценки константы скорости реакции гидролиза новых соединений.
5. Устойчивые бензо[b]тиофен-2-боронаты формируются безбарьерно в активном центре NDM-1 в результате образования ковалентной связи с каталитическим гидроксид-анионом. Все рассмотренные ингибиторы этого ряда характеризуются величинами IC50 не ниже 30 μ M.

Основные публикации Кривицкой Александры Вячеславовны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.8. – Математическая биология, биоинформатика (физико-математические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах).

1. Khrenova M.G., **Krivitskaya A.V.**, Tsirelson V.G., The QM/MM-QTAIM approach reveals the nature of different reactivity of cephalosporins in the active site of L1 Metallo- β -Lactamase // *New Journal of Chemistry*. – 2019. – Vol. 43. – № 19. – P. 7329-7338 (**JIF 3.3, 0.91/0.60 п. л.**).
2. **Krivitskaya A.V.**, Khrenova M.G. Boronic Acids as Prospective Inhibitors of Metallo- β -Lactamases: Efficient Chemical Reaction in the Enzymatic Active Site Revealed by Molecular Modeling // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 7. – P. 2026-2039 (**JIF 4.6, 1.27/0.90 п. л.**).
3. **Кривицкая А.В.**, Хренова М.Г. Молекулярное моделирование активации цефтриаксона в активных центрах пенициллин-связывающих белков 2 // *Известия Академии наук. Серия химическая*. – 2022. – Т. 71. – № 5. – С. 915-920 (**РИНЦ 1.71, 0.47/0.42 п. л.**); (переводная версия: Krivitskaya A.V., Khrenova M.G. Molecular modeling of ceftriaxone activation in the active sites of penicillin-binding proteins 2 // *Russian Chemical Bulletin*. – 2022. – Vol. 71. – № 5. – P 915-920 (**SJR 0.297, 0.42/0.36 п. л.**)).
4. **Krivitskaya A.V.**, Khrenova M.G. Interplay between the Enamine and Imine Forms of the Hydrolyzed Imipenem in the Active Sites of Metallo- β -lactamases and in Water Solution // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2022. – Vol. 62. – № 24. – P. 6519-6529 (**JIF 5.6, 1.03/0.70 п. л.**).
5. **Krivitskaya A.V.**, Khrenova M.G. Influence of the Active Site Flexibility on the Efficiency of Substrate Activation in the Active Sites of Bi-Zinc Metallo- β -Lactamases // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – № 20. – P. 7031-7043 (**JIF 4.6, 1.34/0.90 п. л.**).
6. **Krivitskaya A.V.**, Khrenova M.G. Evolution of Ceftriaxone Resistance of Penicillin-Binding Proteins 2 Revealed by Molecular Modeling // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 1. – P. 176-188 (**JIF 5.6, 1.20/0.90 п. л.**).