

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доцент Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол №\_\_\_\_ засідання кафедри  
від “\_\_\_\_” \_\_\_\_\_2022 р.

**ПОШУК НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ МЕМБРАННИХ МІШЕНЕЙ ДЛЯ  
ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ ПРОТИ АСІНЕТОВАСТЕР ВАУМАННІІ  
АТСС 19606 МЕТОДАМИ СУБТРАКТИВНОЇ ПРОТЕОМІКИ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
Студента спеціальності  
091 Біологія

ОП «Біологія (високі технології)»

**Шматкова Максима Валерійовича**

Науковий керівник від кафедри  
асистент кафедри молекулярної  
біотехнології та біоінформатики  
к.ф.-м.н. **Войтешенко Іван Сергійович**

Робота виконана у відділі біомедичної хімії  
Інституту молекулярної біології і генетики  
Під керівництвом д.х.н. **С.М. Ярмолюка**

Оцінка захисту роботи

---

**Київ – 2022 р.**

## РЕФЕРАТ

Шматков М.В. Пошук нових потенційних мембранних мішеней для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 методами субтрактивної протеоміки. — Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

У даній роботі за допомогою методів субтрактивної протеоміки було проаналізовано протеом бактерії *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, змодельовано структури протеїнів, передбачено сайти зв'язування для низькомолекулярних сполук та визначено ряд нових потенційних мембранних мішеней для лікарських препаратів.

Встановлено, що 6 білків відповідають вимогам для того, щоб бути новими потенційними мембранними мішенями для лікарських препаратів, а саме: негомологічні до білків людини, незамінні, беруть участь лише в унікальних для бактерії відносно людини метаболічних шляхах, локалізуються в плазматичній мембрані, мають сайти для зв'язування низькомолекулярних сполук та не мають відомих лікарських препаратів, що з ними взаємодіють.

Отримані результати можуть бути корисними для розробки лікарських засобів та лікування інфекційних захворювань, спричинених *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 та інших збудників хвороб.

**Ключові слова:** *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606; субтрактивна протеоміка; мішені для лікарських засобів; мембранні білки.

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b> .....	4
<b>РОЗДІЛ 1.</b> Огляд літератури.....	6
1.1. Характеристика <i>Acinetobacter baumannii</i> та хвороби, спричинені цим патогеном.....	6
1.1.1. Загальна характеристика <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	6
1.1.2. Механізми вірулентності <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	8
1.1.3. Хвороби, спричинені <i>Acinetobacter baumannii</i> , їх лікування та складнощі з цим пов'язані.....	10
1.2. Резистентність бактерій до антибіотиків. Механізми резистентності та її утворення.....	12
1.2.1. Набуття бактеріями антибіотикорезистентності.....	13
1.2.2. Механізми антибіотикорезистентності.....	14
1.3. Підходи до відкриття та створення нових антибіотиків.....	17
<b>РОЗДІЛ 2.</b> Матеріали та методи дослідження.....	21
2.1. Підходи субтрактивної геноміки та субтрактивної протеоміки для пошуку мішеней для лікарських препаратів та вакцин.....	21
2.2. Методологія дослідження. Інструменти лінійної біоінформатики для аналізу амінокислотних послідовностей білків.....	23
2.3. Інструменти структурної біоінформатики для аналізу протеїнів.....	26
<b>РОЗДІЛ 3.</b> Результати дослідження та їх обговорення.....	29
3.1. Результати застосування інструментів лінійної біоінформатики.....	29

3.2. Результати застосування інструментів структурної біоінформатики....	31
3.3. Характеристика нових потенційних мембранних мішеней для лікарських препаратів проти <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606.....	32
3.4. Обговорення результатів дослідження.....	35
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>37</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>38</b>

## ВСТУП

Антибіотики є одним із найважливіших та найпоширеніших методів лікування бактеріальних захворювань людини. Вони легко отримуються, прості у застосуванні, ефективні, не викликають серйозних побічних ефектів. Їх можна комбінувати між собою для досягнення кращого результату та часто можуть діяти на багатьох збудників одночасно. Проте їх неналежне використання часто може становити загрозу для людей, оскільки при цьому у бактерій розвивається резистентність до антибіотиків, з якими вони контактували. Небезпечним також є виникнення так званих «супербактерій», які, в теорії, можуть бути резистентними до усіх наявних антимікробних препаратів.

*Acinetobacter baumannii* є грам-негативним опортуністичним патогеном (тобто вражає людей з пригніченою імунною системою), викликаючи пневмонії, менінгіти, інфекції кровоносної та видільної систем. Завдяки здатності швидко набувати резистентність до антибіотиків, цей збудник є однією з головних причин внутрішньолікарняних інфекцій (хоча не обмежується ними) і може проникати в організм пацієнтів під час проведення операцій, через відкриті рани, катетери та апарати штучної вентиляції легень [1]. Наразі для лікування інфекцій, спричинених *Acinetobacter baumannii* використовуються такі антибіотики, як карбапенеми, сульбактам, рифампіцин, колістин, тигециклін та їх комбінації [2]. Хоча стійкість до них виникає у невеликій кількості бактерій, це не означає, що ці препарати залишаться такими ж ефективними й у майбутньому.

Актуальність цієї роботи полягає в тому, що з часом кількість бактерій, що є резистентними до антибіотиків, зростає, і на сьогодні важливою є розробка нових протимікробних препаратів, що будуть результативними для лікування інфекцій, спричинених такими мікроорганізмами.

Оскільки важливим етапом відкриття нових антибіотиків є вибір мішені, на яку вони будуть діяти, метою даної роботи є визначення нових

потенційних мембранних мішеней для розробки лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 за допомогою методів субтрактивної протеоміки. Відповідно до мети, ми поставили перед собою наступні завдання:

1. Ознайомитись із наявною на цю тему літературою, інструментами для пошуку мішеней та вибрати алгоритм роботи, спираючись на проведені в минулому дослідження.
2. Провести послідовний аналіз протеому досліджуваної бактерії за допомогою підходу субтрактивної протеоміки відповідно до вибраного алгоритму роботи.
3. Отримати список нових потенційних мембранних мішеней та знайти про них інформацію в літературних джерелах.
4. Проаналізувати отримані результати та зробити висновки про перспективність подальшого дослідження ідентифікованих мішеней.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Характеристика *Acinetobacter baumannii* та хвороби, спричинені цим патогеном

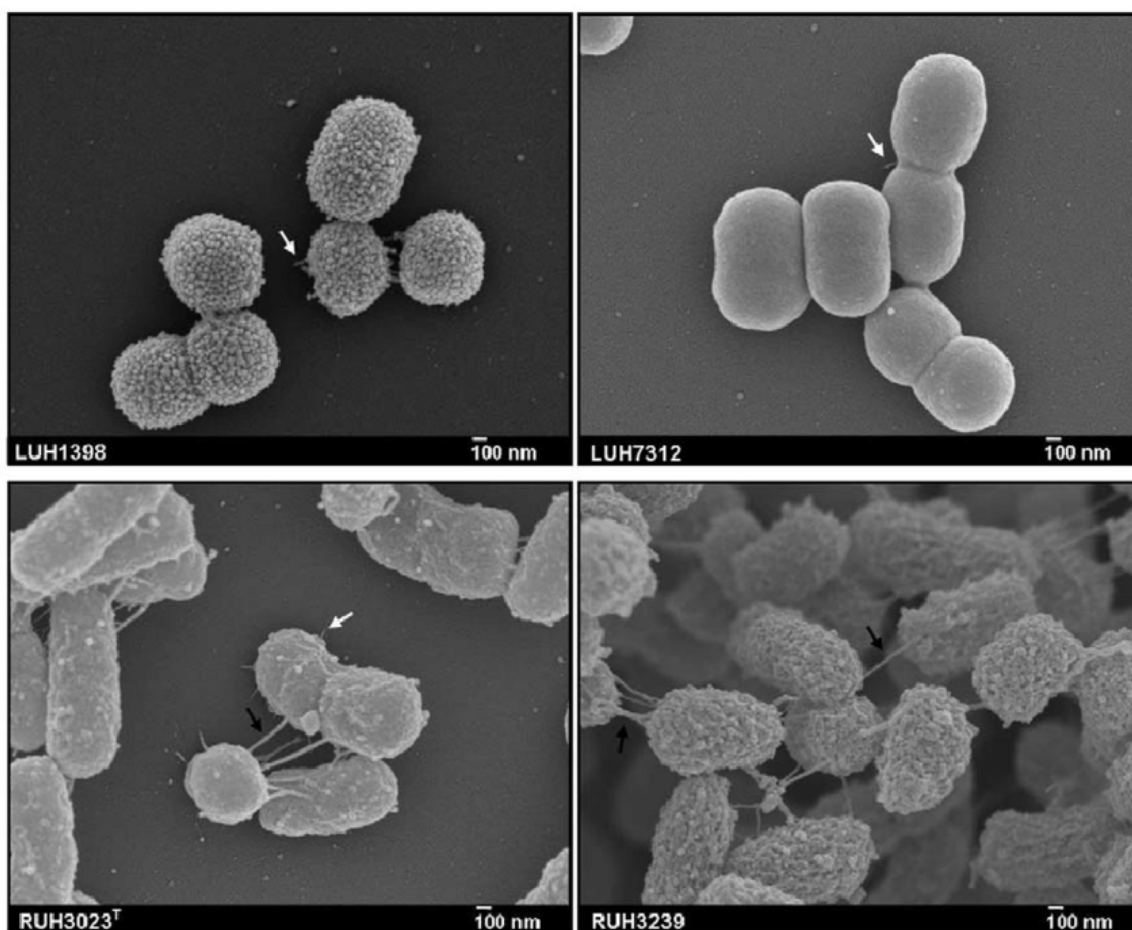
##### 1.1.1. Загальна характеристика *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter baumannii* — невибаглива грам-негативна аеробна бактерія, що має морфологію кокобацили, не має джгутиків, оксидазної активності, не метаболізує глюкозу, має каталазну активність. Вміст G+C в її ДНК коливається від 39% до 47%. Бактерії роду *Acinetobacter* при 37 °C утворюють сірувато-білі гладкі мукоїдні колонії на твердих середовищах, які зазвичай використовуються для діагностичних цілей. Серед видів роду *Acinetobacter*, *Acinetobacter baumannii* є найважливішим представником, пов'язаним з внутрішньолікарняними інфекціями у всьому світі. Бактерія є успішним патогеном, відповідальним за опортуністичні інфекції шкіри, кровотоку, сечовивідних шляхів та інших м'яких тканин. Оскільки серед ветеранів та солдатів, які служили в Іраку та Афганістані, раптово було зареєстровано багато інфекцій викликаних *A. baumannii*, її ще називають «Iraqibacter».

*A. baumannii* було віднесено до групи збудників ESKAPE з високим рівнем стійкості до антибіотиків, які є відповідальними за більшість внутрішньолікарняних інфекцій. *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex (ACB complex) включає п'ять видів *Acinetobacter*, пов'язаних із захворюваннями людини (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* та *A. dijkschoorniae*) та один вид ізольований із ґрунту і не вважається збудником захворювань людини (*A. calcoaceticus*). Види цього

комплексу тісно споріднені і їх важко розрізнити за фенотиповими властивостями [3].

Більшість інфекцій *A. baumannii* виникають у важкохворих пацієнтів і становлять до 20% інфекцій у відділеннях інтенсивної терапії у всьому світі. Кілька факторів вірулентності були ідентифіковані за допомогою геномного та фенотипічного аналізу, включаючи порини зовнішньої мембрани, фосфоліпази, протеази, ліпополісахариди, капсульні полісахариди, системи секреції білків та залізо-хелатні системи. Багато звітів показали, що *A. baumannii* швидко розвиває стійкість до антимікробних препаратів, і були виділені мультирезистентні штами цієї бактерії [4].



**Рис. 1.1.** Мікрофотографії, зроблені за допомогою сканувальної електронної мікроскопії клітин різних штамів *Acinetobacter baumannii*. Адаптовано з [5]

### 1.1.2. Механізми вірулентності *Acinetobacter baumannii*

Фактори вірулентності — характерні для бактерії системи та структури, які забезпечують успішну взаємодію з хазяїном і його подальшу колонізацію. Хоча *A. baumannii* має багато загальних ознак, притаманних для патогенів людини, унікальною є очевидна відсутність будь-яких токсинів або молекулярних механізмів, які могли б пояснити вірулентність конкретного штаму *A. baumannii*. Натомість сучасне розуміння вірулентності *A. baumannii* передбачає стратегію «стійкість та протидія». Зокрема, *A. baumannii* має потужну здатність виживати в дуже несприятливих умовах.

Здатність підтримувати життєздатність у сухих умовах різниться між клінічними ізолятами *A. baumannii*, при цьому деякі залишаються життєздатними майже 100 днів. Сстійкість до висихання у *A. baumannii* багатофакторна і ще не повністю визначена. В *Acinetobacter baylyi*, непатогенного родича *A. baumannii*, капсульні полісахариди (які складаються з повторюваних вуглеводних одиниць і функціонують як глікановий щит, що охоплює всю бактерію та захищає від зовнішніх загроз) сприяють виживанню під час періодів висихання. Хоча прямих доказів бракує, враховуючи подібні шляхи біосинтезу в *A. baumannii*, здатність капсули утримувати воду в *A. baumannii* і наявність капсульного полісахариду, що покриває клітини *A. baumannii* вирощені в сухих умовах, ймовірно, капсула сприяє стійкості до висихання. Крім того стійкість до висихання пов'язана зі складом зовнішньої мембрани. Мутантний штаму, який продукує недостатньо ацильований ліпоолігосахарид, не зміг пережити висихання. Щоб запобігти деяким пошкодженням ДНК, спричиненим висушуванням і подальшою регідратацією, *A. baumannii* покладається на захисну роль білка RecA, який є ферментом, необхідним для гомологічної рекомбінації та репарації.

*A. baumannii* має значно активнішу регуляцію білків, які пов'язані з детоксикацією активних форм кисню. Вважається, що деякі представники мають найвищу толерантність до перекису водню після спороутворюючих грампозитивних бактерій.

Було показано, що *A. baumannii* активно виводить хлоргексидин з клітини за допомогою pomp викачування, що сприяє виживанню бактерій в умовах стресу. Інший стресор, етанол, у низьких концентраціях навпаки сприяє росту та вірулентності *A. baumannii*. Більше того, вважається, що хронічне вживання алкоголю є одним із основних факторів ризику, пов'язаних із внутрішньолікарняними інфекціями *A. baumannii*.

Біоплівки відіграють важливу роль у взаємодії *A. baumannii* з хазяїном. Патоген в межах інфікованих регіонів шкіри та м'яких тканин утворює міцні біоплівки як у рані, так і на пов'язках. *A. baumannii* також утворює сукупність біоплівок на більшості абіотичних поверхонь, включно з медичним обладнанням. Загальновідомо, що бактерії в біоплівкових спільнотах, включаючи *A. baumannii*, мають підвищену толерантність до позаклітинних стресів. Хоча фактори, які сприяють утворенню біоплівки, залежать від штаму, існують і деякі загальні фактори.

Зазвичай, рухливість бактерій тісно пов'язана зі здатністю викликати захворювання. Гіперрухливість *A. baumannii* була пов'язана з підвищеною вірулентністю і навпаки, мутанти з дефектом рухливості мають ослаблений фенотип. Крім того, дослідження клінічних ізолятів *A. baumannii* виявили, що більша рухливість може забезпечити кращу життєздатність бактерій в деяких місцях. Хоча «*Acinetobacter*» перекладається як «нерухома паличка», штами *A. baumannii* та *A. nosocomialis* здатні до двох незалежних форм бактеріальної локомоції: рухливості, пов'язаної з поверхнею, та рухливості за допомогою пілі IV типу. Хоча для *A. baumannii* не спостерігається прямого зв'язку між пілі типу IV та вірулентністю, було показано, що гени, які кодують білки, необхідні для біогенезу пілі IV типу, активізуються під час росту бактерій в сироватці людини, що вказує на їх важливість під час бактеріємії. Рухливість

*A. baumannii*, пов'язана з поверхнею, залежить від синтезу 1,3-діамінопропану, системи чуття кворуму та ліпоолігосахаридів.

Пошук систем, гомологічних до факторів вірулентності інших патогенів людини, призвело до ідентифікації механізмів глікозилювання та секреції білків, а також механізмів отримання мікроелементів [6].

### **1.1.3. Хвороби, спричинені *Acinetobacter baumannii*, їх лікування та складнощі з цим пов'язані**

*Acinetobacter baumannii* викликає пневмонії, менінгіти, інфекції кровоносної та видільної систем, а смертність від них може досягати 35%. Спалахи інфекцій часто асоціюються з мультирезистентними штамми, включаючи появу штамів, стійких до всіх доступних антибіотиків. *Acinetobacter baumannii* є причиною від 2 до 10% від усіх внутрішньолікарняних інфекцій, викликаних грам-негативними патогенами. *A. baumannii* вперше став значною проблемою в 1970-х роках. Відтоді *A. baumannii* поступово набирає значення як патогенний організм, головним чином внутрішньолікарняних інфекцій, але ними не обмежуючись.

Інфекції частіше зустрічаються у пацієнтів, які мають важкий перебіг іншого захворювання або нещодавно перенесли серйозні хірургічні операції. *Acinetobacter baumannii* легко проникає в організм через відкриті рани, катетери та апарати штучної вентиляції легень. Найважливішою інфекцією з найвищим рівнем смертності є вентиляційна пневмонія, рівень смертності від якої коливається у межах 40-70%. Також небезпечними є інфекції кровоносної системи, рівень смертності від яких коливається у діапазоні 28-43%. До факторів ризику належать пацієнти з гострим інфарктом міокарда, іншими інфекціями кровоносної системи, імунодепресивним станом, а також особи, під'єднані до апаратів ШВЛ та попереднім лікуванням антибіотиками.

*Acinetobacter baumannii* бере участь у розвитку близько 22% опікових інфекцій, і в основному поширюється серед військовослужбовців, при цьому рівень інфекцій, спричинених мультирезистентними штамми становить близько 53%. Крім того, *A. baumannii* може викликати інфекції, пов'язані з центральною нервовою системою та видільною системою [7].

Будь-яка внутрішньолікарняна інфекція, спричинена *A. baumannii*, вимагає антимікробної терапії, яка базується на чутливості збудника до окремих антибіотиків. Загальні варіанти лікування включають цефтазидим, карбапенеми, сульбактам, піперацилін/тазобактам, аміноглікозиди, хінолони (наприклад, левофлоксацин), цефепім, поліміксини E і B, міноциклін, доксициклін і тигециклін. Слід зазначити, що *A. baumannii* сприйнятливий до фаготерапії. Важливо й те, що стратегії лікування важких інфекцій, спричинених *Acinetobacter baumannii*, особливо її мультирезистентними штамми, в основному базуються на звітах про окремі випадки, серії випадків або невеликих дослідженнях. Тривалість лікування загалом подібна до інших внутрішньолікарняних інфекцій, спричинених грамнегативними паличками. Вона залежить переважно від тяжкості захворювання. Однак слід зазначити вплив ранньої відповідної антимікробної терапії на виживання пацієнтів [8].

*Acinetobacter baumannii* не був би проблемним патогеном без наявності множинних механізмів стійкості до антибіотиків, якими зазвичай володіють штамми цього патогену, та їх здатності швидко набувати нових. У ізолятах *A. baumannii* виявлено безліч вроджених і набутих механізмів резистентності. Вони включають ферментативну модифікацію антибіотика, зміну проникності мембран, наявність помп, що викачують антибіотик з клітини, та модифікації мішені для препарату. Існують мультирезистентні (MDR; стійкість до принаймні трьох класів антибіотиків), XDR (MDR плюс резистентність до карбапенемів) і PDR (XDR плюс стійкість до поліміксинів) штамми *A. baumannii* що наразі ізолюються з лікарень. Наявність цих мультирезистентних штамів сильно ускладнює лікування пацієнтів [9].

### **2.3. Резистентність бактерій до антибіотиків. Механізми резистентності та її утворення**

Антибіотикорезистентність — це природна або набута організмом стійкість до одного або декількох антибіотиків. Вона є очікуваним результатом взаємодії багатьох організмів з навколишнім світом і могла виникати навіть у дуже давніх мікроорганізмів. Багато антимікробних сполук зустрічаються у природі, і бактерії, що жили в середовищі з високою концентрацією цих речовин, розвинули механізми боротьби з їх дією, щоб вижити. Посилення конкуренції в середовищах з обмеженим вмістом поживних речовин у поєднанні з повільними темпами зростання збільшує значення виробництва антибіотиків, а отже і стійкість до них. Такі організми мають природну стійкість до одного або декількох антимікробних препаратів. Однак при обговоренні антибіотикорезистентності, вроджена стійкість не є основною проблемою. Як правило, в більшості клінічних випадків бактеріальних захворювань, мається на увазі резистентність мікроорганізмів до сполуки, яка раніше діяла на бактеріальні клітини, тобто набута стійкість.

Найчастіше метою використання антибіотиків є знищення бактерій за допомогою досить високих його концентрацій. Ключовим поняттям тут є мінімальна інгібувальна концентрація (МІК), тобто найменша концентрація препарату, що пригнічує видимий ріст бактерій. Однак масове використання антибіотиків і їх потрапляння в навколишнє середовище створює такі умови для мікроорганізмів, де концентрація препаратів буде нижчою за МІК. Не зважаючи на те, що в такому середовищі популяції бактерій не будуть вимирати, антибіотик буде мати певний негативний вплив на мікроорганізм.

Він стимулюватиме їх виробляти механізми для захисту від препарату. Збільшиться частота мутацій в геномі, фенотипова та генотипова різноманітність бактерій, утвориться резистентність до цього антибіотика [10].

Важливо визнати, що поняття резистентності/сприйнятливості у клінічній практиці є відносним явищем із багатьма рівнями складності. Встановлення меж клінічної чутливості мікроорганізмів до протимікробних сполук (сприйнятливість, проміжна реакція та резистентність) в основному залежить від активності антибіотика щодо великої кількості бактерій *in vitro* у поєднанні з деякими фармакологічними параметрами (наприклад, концентрація антибіотика в крові та в місці запалення). Таким чином, при лікуванні пацієнтів, у яких інфекція спричинена стійкими до антибіотиків бактеріями, рівень сприйнятливості може змінюватися залежно від клінічного сценарію. Наприклад, якщо вдається досягти високої концентрації антибіотика в сечі, можливе лікування інфекції нижніх відділів сечовивідних шляхів, спричиненої організмом, який є стійким до цього препарату. Крім того, сприйнятливість організму до певного антибіотика може змінюватися залежно від розміру бактеріального ураження. Існують дані, які свідчать про те, що деякі цефалоспорини можуть бути не ефективними в лікуванні інфекцій, що глибоко залягають всередині тканин, і викликані чутливим до цефалоспоринів золотистим стафілококом [11].

### **1.2.1. Набуття бактеріями антибіотикорезистентності**

Бактеріальні клітини мають видатну пластичність геному, що дозволяє їм швидко адаптуватись до змін умов навколишнього середовища, в тому числі і до появи у ньому антибіотиків. Бактерії за свою довгу еволюцію розвинули два основних механізми адаптація та набуття стійкості до токсичних для них речовин: 1) мутації в генах, що пов'язані з механізмом дії

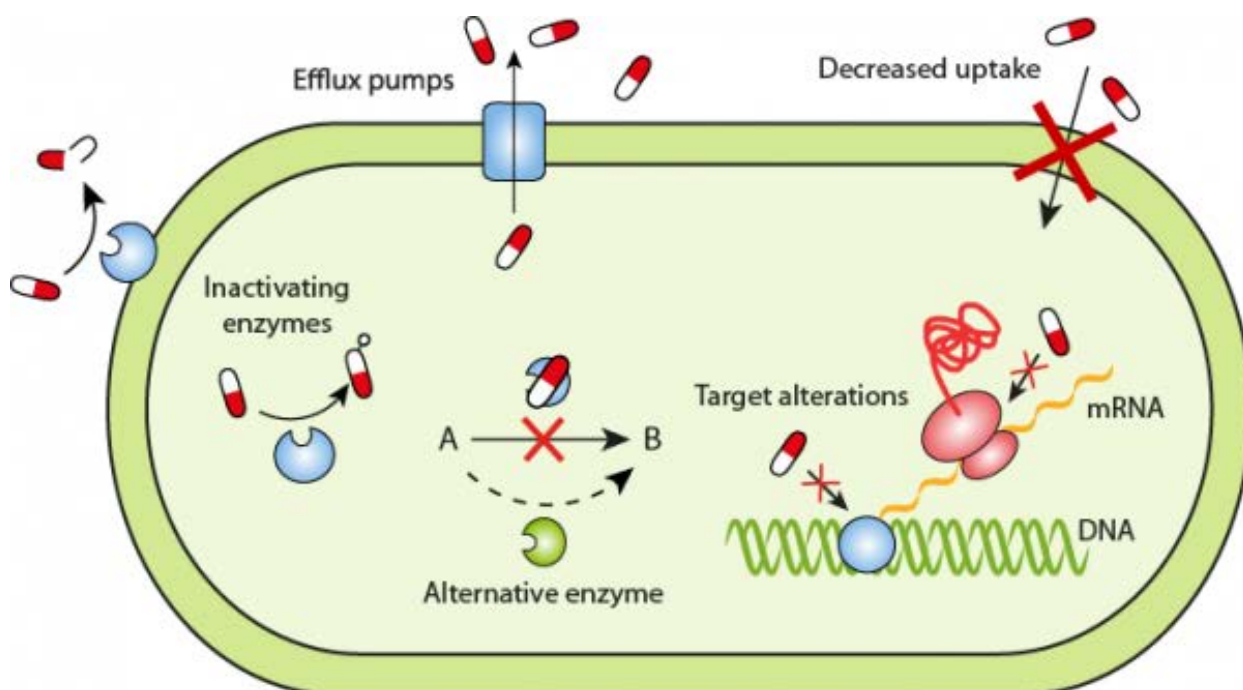
антибіотика (мутаційна резистентність); 2) отримання чужорідної ДНК, яка забезпечує резистентність бактерії до певного препарату (горизонтальне перенесення генів).

У випадку мутаційної резистентності, в генах сприйнятливих до антибіотика бактеріальних клітин розвиваються мутації, які впливають на активність препарату. Це призводить до виживання клітин у присутності молекул препарату. Антибіотик ліквідує сприйнятливую до нього популяцію клітин, а стійкі бактерії виживають. У багатьох випадках мутаційні зміни, що призводять до резистентності, є шкідливими для клітинного гомеостазу і підтримуються лише за необхідності.

Потрапляння в клітину чужорідної ДНК з генами, що відповідають за стійкість до антибіотиків, також може бути причиною появи резистентності. Цей процес називається горизонтальним перенесенням генів. Він є одним з найважливіших факторів еволюції бактерій. Бактеріальні клітини можуть отримувати чужорідну ДНК за допомогою трьох основних механізмів: трансформації, трансдукції та кон'югації. Трансформація передбачає захоплення вільної чужорідної ДНК із навколишнього середовища. Хоча це найпростіший із наведених процесів, резистентність таким чином можуть набувати лише деякі клінічно релевантні бактерії. Трансдукція — це процес перенесення ДНК від однієї бактерії до іншої за допомогою бактеріофагів. Проте найважливішим механізмом набуття резистентності за допомогою горизонтального перенесення генів є кон'югація. В основі цього методу лежить утворення цитоплазматичного містка між двома бактеріальними клітинами, через який ДНК (у вигляді плазмід, транспозонів чи інших структур) переходить із однієї бактерії до іншої. Також одним із важливих та цікавих механізмів горизонтального перенесення генів для набуття стійкості є інтегрони. Вони забезпечують досить просте та ефективне вбудовування нових генів в бактеріальну хромосому та забезпечують їх експресію.

### 1.2.2. Механізми антибіотикорезистентності

Бактерії протягом мільйонів років еволюції розвивали складні механізми стійкості, щоб уникати ураження від антибіотиків. Стійкість до одного класу препаратів, як правило, може бути досягнута за допомогою різних біохімічних шляхів, і одна бактеріальна клітина може бути здатною використовувати весь спектр механізмів стійкості, щоб пережити дію



антибіотика. За біохімічними та фізіологічними змінами у клітині для набуття резистентності, ці механізми можна класифікувати наступним чином: 1) механізми модифікації молекули антибіотика; 2) зниження проникності антибіотика до клітини та його виведення з неї; 3) зміна структури мішені антибіотика або позбавлення від неї; 4) глобальні перебудови метаболічних шляхів.

**Рис. 1.2.** Різні механізми стійкості до антибіотиків у бактерій.

Адаптовано з [12]

Вироблення ферментів, що інактивують або розщеплюють молекули антибіотиків, є одним із найуспішніших механізмів резистентності. Такі хімічні модифікації, що направлені на інактивацію, як ацетилювання,

фосфорилування та аденілювання є найпоширенішими і зустрічаються як в грам-позитивних, так і в грам-негативних бактерій. Незалежно від виду реакції, вони направлені на зменшення спорідненості препарату до його мішені, що виражається у підвищенні МІК. Класичним прикладом ферментів, що розщеплюють молекули антибіотику, можна назвати  $\beta$ -лактамази, що розривають  $\beta$ -лактамне кільце антибіотиків, тим самим нівелюють їх токсичну дію.

Багато сучасних антибіотиків, перед тим як подіяти, мають спочатку проникнути в бактерію, оскільки їх мішень знаходиться всередині клітини. У відповідь до таких антибіотиків бактерії розвинули механізми, що перешкоджають проникненню молекул препарату всередину або швидко виводять їх назовні. Наприклад, багато антибіотиків для проникнення в клітину використовують білки-порини, що забезпечують зв'язок внутрішнього вмісту бактерії з навколишнім середовищем. Модифікація структури цих білків, зменшення їх кількості на поверхні клітини та експресія селективних поринів впливають на швидкість проникнення молекул препарату всередину бактерії. Паралельно з цим можуть продукуватись комплекси, що виводять антибіотик з клітини назовні за допомогою енергії АТФ або градієнту протонів.

Поширеним механізмом захисту від антибіотиків є зміна структури мішені так, щоб антибіотик не міг зв'язатися з нею. Цього можна досягти за допомогою використання захисних білків, які не дають антибіотику потрапити до сайту зв'язування, або модифікації цільової ділянки, що знижує афінність молекул препарату до мішені. Останнє відбувається за рахунок точкових мутацій в генах, що кодують мішень, їх змін під час посттрансляційної модифікації або повної заміни сайту зв'язування на інший.

Багато бактерій проживають у дуже небезпечних середовищах, де на них діє багато стресових факторів. До них можна віднести і людське тіло з його імунною системою. Тому за мільйони років еволюції вони розвинули різноманіття складних механізмів, що забезпечують можливість глобальних

фізіологічних змін своїх клітин для адаптації та уникнення порушень важливих клітинних процесів [12].

### **2.3. Підходи до відкриття нових антимікробних лікарських препаратів**

Останні оцінки показують, що для виведення нового препарату на ринок потрібно приблизно 13 років і 1,8 мільярдів доларів США. Ця вартість включає як розробку препарату, що потрапив на ринок, так і вартість розробки ліків, які виявилися невдалими та не потрапили на полиці аптек. Розробка препаратів може зазнати невдачі на різних етапах процесу відкриття ліків, зокрема на пізніх стадіях розробки [13]. Зменшення витрат грошей і часу на кожен з етапів розробки ліків, без погіршення їх якості, є ключем до своєчасної доставки кращих ліків пацієнтам та боротьби з резистентними організмами [14].

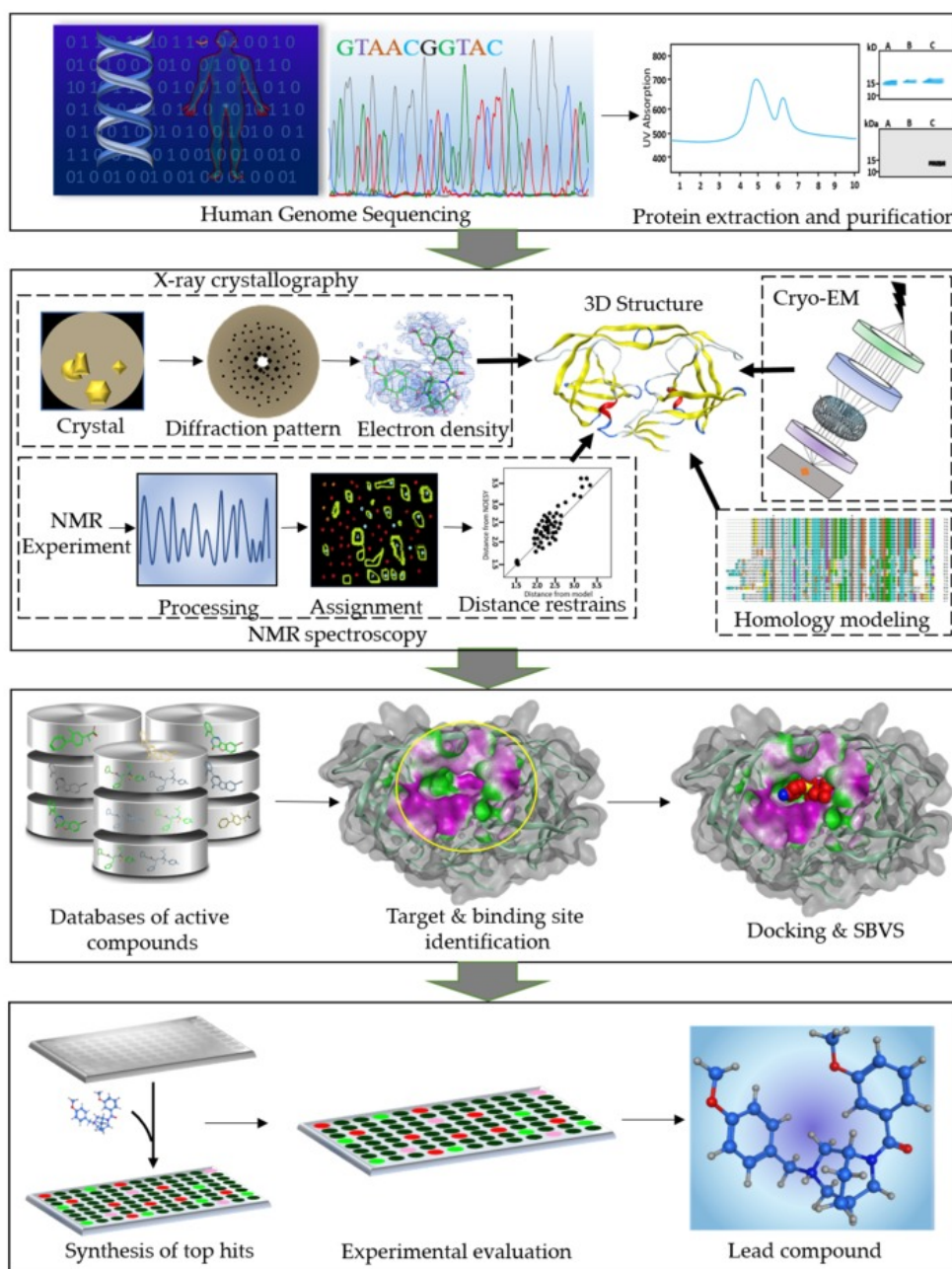
Коли для терапії починають застосовувати новий антибіотик, зазвичай на початку він є дуже ефективним. Проте потім, завдяки виживанню невеликої частки популяцій бактерій, які мають внутрішній або набутий механізм стійкості, збудники, стійкі до дії цього антибіотика, з'являються по всьому світу. Через неминучий розвиток резистентності, що слідує за використанням препаратів, існує постійна потреба у розробці нових антибіотиків.

Зусилля з виявлення антибіотиків протягом останніх 70 років можна розділити на дві різні групи: виділення сполук з природних джерел та створення синтетичних препаратів.

У «золоту еру» відкриття нових антибіотиків більшість препаратів знаходили в мікроскопічних грибах, вищих рослинах та лишайниках.

Природні антибіотики, як правило, мають складну структуру та щільно розміщені функціональні групи для специфічної взаємодії з мішенями патогенних бактерій. Проблемою стало те, що у великих молекул біодоступність при пероральному прийомі обмежена. Іншими перешкодами на шляху до відкриття нових антибіотиків є важкість культивування багатьох мікроорганізмів та висока ймовірність того, що в результаті дослідження може бути відкрита молекула, яка вже є відомою. Тому сполуки, одержані з природних джерел стали базою для моделювання напівсинтетичних аналогів природних антибіотиків. Проте з кожним роком виділяється все менше нових

сполук, і можливо, що скоро пошук невідкритих природних антибіотиків стане занадто затратним і неефективним. З іншого боку, людство відкрило лише невелику частину живих організмів, ще менше дослідило в лабораторії. Тому природа може приховувати ще велику кількість невідомих сполук з сильною протимікробною активністю. Тому для пошуку потенційних кандидатів у лікарські засоби використовують метагеномні дослідження зразків маловивчених регіонів та океанів Землі [15], [16].



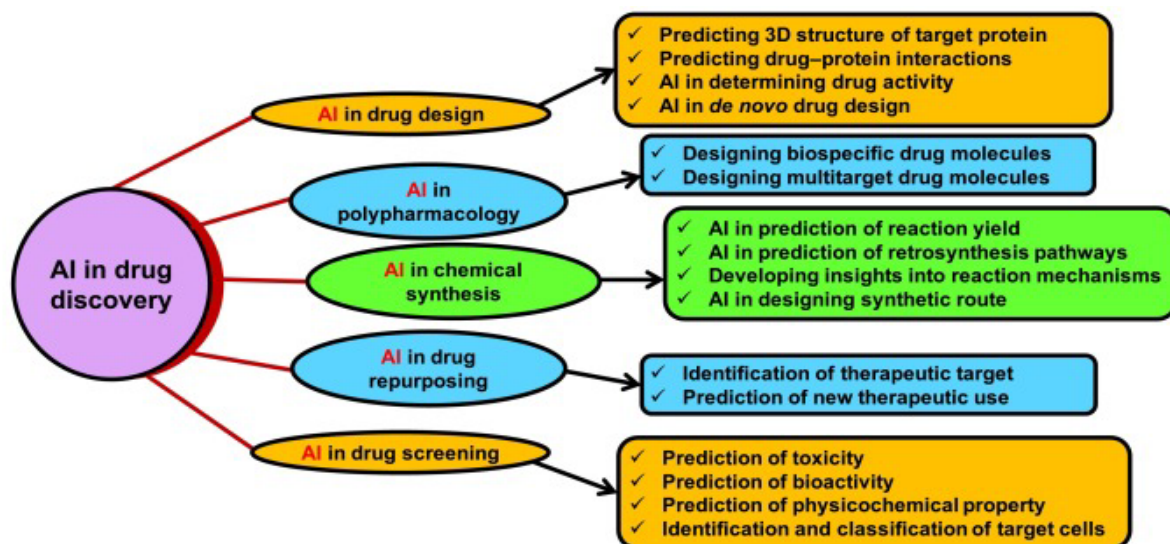
**Рис. 1.3.** Загальний алгоритм відкриття нового антибіотика за допомогою методів реверсивної фармакології. Адаптовано з [17]

Створення синтетичних препаратів передбачає синтез біологічно активних сполук на основі структур, що відсутні у природі. До таких антибіотиків належить, наприклад, сульфаметоксазол та фторхінолони. Раніше, до появи методів секвенування всього геному мікроорганізмів, цей напрямок був досить сумнівним, оскільки давав мало якісних препаратів при великих затратах. Проте пізніше, коли з'явилися нові технології, а встановлення нуклеотидної послідовності бактеріальної хромосоми та третинної структури білків стало все простішим, цьому напрямку розробки антибіотиків почали приділяти набагато більше уваги. Великим проривом у цій галузі стала розробка методу віртуального скринінгу на основі молекулярного докінгу, що дозволяє за порівняно короткий проміжок часу проаналізувати величезну кількість сполук абсолютно різної будови на взаємодію з деякими білками-мішенями.

Традиційно, пошук антибіотиків був пов'язаний із дослідженням сполук з відомою активністю та їх механізму дії на мікроорганізми, або природних лігандів, що зв'язуються з критично важливими для бактерії протеїнами, та їх модифікацією. Проте останнім часом набуває популярності підхід реверсивної фармакології, заснований на пошуку потенційних мішеней для лікарських препаратів, з подальшим скринінгом проти бібліотек штучно створених низькомолекулярних сполук. Наявність 3D-структури білка-мішені дає можливість ідентифікувати його сайти зв'язування з низькомолекулярними сполуками, що закладає основу розробки ліків підходом реверсивної фармакології [17].

Експериментальний скринінг великих бібліотек сполук на приклад міцної взаємодії з мішенню є золотим стандартом для виявлення біологічно активних препаратів. Але висока вартість, довготривалість та низька ефективність перешкоджає використанню цього методу. Проте з розвитком

комп'ютерних технологій та різким зростанням кількості біологічних, хімічних, структурних даних почалась розробка дешевих та швидких методів аналізу активності сполук *in silico*. Діджиталізація супроводжується проблемою отримання, ретельного вивчення та застосування цих даних для



вирішення складних клінічних проблем. Це мотивує використання штучного інтелекту (ШІ) та машинного навчання, оскільки вони можуть допомогти якісно обробляти великі обсяги даних [18].

**Рис. 1.4.** Сфери застосування штучного інтелекту для відкриття нових лікарських препаратів. Адаптовано з [18]

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Підходи субтрактивної геноміки та субтрактивної протеоміки для пошуку мішеней для лікарських препаратів та вакцин

Ідентифікація мішені — перший етап розробки лікарського препарату. Оскільки на сьогодні отримати геном та протеом як патогенів, так і їх господарів не є проблемою, визначення мішеней будь-якого організму для лікарських препаратів стало набагато легшим завданням [19].

Субтрактивна геноміка та протеоміка (*англ. Subtractive genomics and proteomics*) — потужний підхід *in silico* для пошуку мішеней як для лікарських препаратів, так і для вакцин. Він широко використовується для визначення нових мішеней з метою розробки ефективних антибактеріальних агентів і вакцин проти бактеріальних патогенів, які або є стійкими до існуючих антибіотиків, або для яких відповідної вакцини немає [20]. Крім того, *in silico* порівняльний аналіз геномів хазяїна та патогена за допомогою субтрактивної геноміки та протеоміки є потужним інструментом для ідентифікації специфічних для роду або виду збудника генів або груп генів, які відповідають за унікальний фенотип та фактори вірулентності [21].

Основою для проведення пошуку потенційних мішеней для лікарських препаратів підходом субтрактивної геноміки та протеоміки є концепт незамінних генів патогену, негомологічних до генів хазяїна. Незамінні гени це такі, що виконують життєвоважливу функцію в організмі, і їх видалення чи блокування роботи призводить до смерті. Ці гени відповідають за ключові процеси в організмі, такі як ріст, розвиток та адаптація, і їх кількість може змінюватись в залежності від середовища проживання (наприклад, для виживання бактерії в організмі людини потрібен один набір незамінних генів, для виживання у повітрі чи воді інший).

Оскільки незамінні гени та їх метаболічні шляхи часто еволюційно дуже консервативні та наявні у багатьох різноманітних організмів, де виконують схожі функції, для пошуку підходящої мішені для антибіотиків потрібно обов'язково врахувати наявність чи відсутність гомології між незамінними генами патогену та генами його хазяїна. Нехтування аналізом на гомологічність призведе до того, що майбутній препарат буде токсичним не тільки для мікроорганізмів, а й для організмів, яких вони вражають.

В ідеалі, білок може називатися мішенню для лікарських препаратів, якщо виконується чотири умови: 1) це має бути незамінний білок, без якого життєдіяльність організму неможлива; 2) білок повинен мати сайти зв'язування з низькомолекулярними сполуками, через які можлива інгібуюча взаємодія лікарського засобу з цим білком; 3) білок має бути охарактеризований функціонально та структурно, з можливістю проведення віртуального скринінгу на великій вибірці низькомолекулярних сполук; 4) білок має відрізнятися від уже відомих мішеней, щоб запобігти крос-резистентності.

Субтрактивна геноміка та протеоміка в своїй основі є досить простим в реалізації та інтуїтивно зрозумілим методом аналізу геномів та протеомів. На початку береться повний список послідовностей, і на кожному етапі аналізу зі списку видаляються ті, що не задовольняють потрібні нам параметри. В кінці-кінців залишається невелика вибірка перспективних послідовностей, які задовольняють усі вимоги та є перспективними для більш глибокого дослідження. В загальному, цитоплазматичні ензими є гарними мішенями для антибіотиків, а білки, що екскретуються назовні можуть бути мішенями для розробки вакцин. Білки-переносники, що розташовані у/на мембрані та інші білки, що є доступними з її поверхні, є корисними для обох цілей.

Базова стратегія пошуку нових потенційних мішеней для лікарських препаратів вперше була розроблена та застосована для *Helicobacter pylori*. Дослідження будувалось на припущенні, що оскільки у паразитичних мікроорганізмів геном менший ніж у споріднених до них вільноживучих, то

гени, що наявні у паразитичних організмів, але відсутні у вільноживучих, забезпечують адаптацію, виживання та патогенність бактерії, а отже є потенційними мішенями [22]. З часом стратегія розвивалась і розширялась, і наразі основна частина методології дослідження виглядає наступним чином. Спочатку з баз даних отримують геноми або протеоми хазяїна (в нашому випадку, це людина) та патогенного мікроорганізму. За допомогою BLAST їх порівнюють та відкидають послідовності патогена, що є гомологічними до людських. Послідовності патогена, що не є гомологічними, порівнюють із базою даних незамінних генів (DEG) та залишають лише ті, що є спорідненими з ними. На наступному етапі порівнюють метаболічні шляхи патогена та хазяїна та залишають ті, що беруть участь лише в унікальних для патогенного мікроорганізму метаболічних шляхах. Потім відбувається визначення чи передбачення локалізації білків в клітині, після чого обираються протеїни для подальшого дослідження як потенційні мішені для лікарських засобів або розробки вакцин.

## **2.2. Методологія дослідження. Інструменти лінійної біоінформатики для аналізу амінокислотних послідовностей білків**

Інструменти лінійної біоінформатики, які використовуються для аналізу білків, досліджують первинну структуру протеїнів. Аналізуючи амінокислотну послідовність можна дізнатися та передбачити велику кількість інформації про спорідненість окремих білків, їх доменну структуру, можливі функції та розташування у клітині. В свою чергу, структурна біоінформатика фокусується на передбаченні та аналізі вторинної, третинної та четвертинної структури білків.

Першим етапом нашого дослідження було отримання протеомів бактерії та людини з бази даних NCBI genomes у форматі FASTA. Нами були

завантажені протеом *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 від Sydney University та референсний протеом людини [23].

Другий етап передбачав видалення паралогів із протеому патогена. Для цього було використане програмне забезпечення USEARCH, однією з можливостей якого є швидкий розподіл протеому на кластери з вказаним рівнем ідентичності [24]. Нами був вибраний поріг ідентичності на рівні 0.6, і всі послідовності, що мали ідентичність вище, були зібрані в один кластер. Ми залишали лише одну послідовність з кожного кластеру.

Третім етапом був аналіз на гомологію між білками патогена та людини. Для цього було застосоване програмне забезпечення BLAST+, що дозволяє швидко порівнювати великі кількості білкових та генетичних послідовностей на ПК [25]. Алгоритм BLAST порівнює дві послідовності між собою та для кожного порівняння виставляє оцінки (Score та E-value), які залежать від ступеню схожості двох послідовностей [26]. Пороговим значенням ми обрали E-value на рівні  $10^{-3}$ , і всі білки патогена, що мали таке значення або менше відносно хоча б одного людського білка, нами відкидалися як гомологічні до людських.

На наступному етапі ми провели порівняння отриманої вибірки з базою незамінних генів (DEG). DEG містить результати повногеномних досліджень незамінності генів багатьох організмів у різних умовах за останні роки, а також має вбудований інструмент пошуку послідовностей на основі BLAST [27]. Для дослідження ми мали завантажити список незамінних білків *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 у форматі FASTA та порівняти з отриманими після попереднього етапу послідовностями за допомогою програмного забезпечення BLAST+. Показник E-value був встановлений на рівні  $10^{-5}$ . Після цього етапу ми отримуємо список із незамінних протеїнів, негомологічних до людських білків, що є основою для подальшого дослідження.

Наступний етап передбачав порівняння метаболічних шляхів, у яких беруть участь білки із отриманого списку, та людських метаболічних шляхів.

Для цього був застосований ресурс від KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) під назвою KAAS (KEGG Automatic Annotation Server). KEGG це база даних для системного аналізу функцій генів з точки зору мереж генів і молекул. Основним компонентом KEGG є база даних PATHWAY, яка складається з графічних діаграм біохімічних шляхів, включаючи більшість відомих метаболічних шляхів і деякі відомі шляхи регулювання [28]. KAAS порівнює введenu послідовність з існуючими в базі даних, і передбачає функції гену/білка та метаболічні шляхи, в яких він бере участь [29]. Порівнюючи біохімічні процеси, у яких бере участь той чи інший білок, з людськими біохімічними процесами, можна визначити чи бере цей протеїн участь у перетвореннях речовин та їх регуляції, які є і у людини. Після проведення цього етапу ми позбавились білків, що брали участь хоча б у одному метаболічному шляху, що наявний у людини.

Далі ми мали визначити білки, які вже були відомі як мішені для лікарських препаратів, та мають затверджені або експериментальні препарати, що з ними взаємодіють. Для цього ми використали базу даних DrugBank Online — це всеосяжна, безкоштовна база даних, що містить інформацію про лікарські препарати, механізми дії, взаємодії та найважливіше для нас — їх мішені [30]. Для порівняння відомих мішеней з тими, що ми отримали на попередніх етапах, ми використали вбудований у базу даних пошук мішеней за допомогою BLAST. Пороговий показник E-value був встановлений на рівні  $10^{-5}$ . Всі білки, що показали подібність до мішеней з відомими лікарськими препаратами, були відкинуті.

Останнім етапом застосування інструментів лінійної біоінформатики стало визначення локалізації білків у клітині бактерії. Для цього ми використали три інструменти, що на основі амінокислотної послідовності білків можуть передбачати де саме вони розташовані. Першим інструментом був PSORTb версії 3.0.3, який, як зазначають автори, є найточнішим інструментом передбачення субклітинної локалізації протеїнів для прокариотів [31]. Для дослідження ми використали онлайн-версію цієї

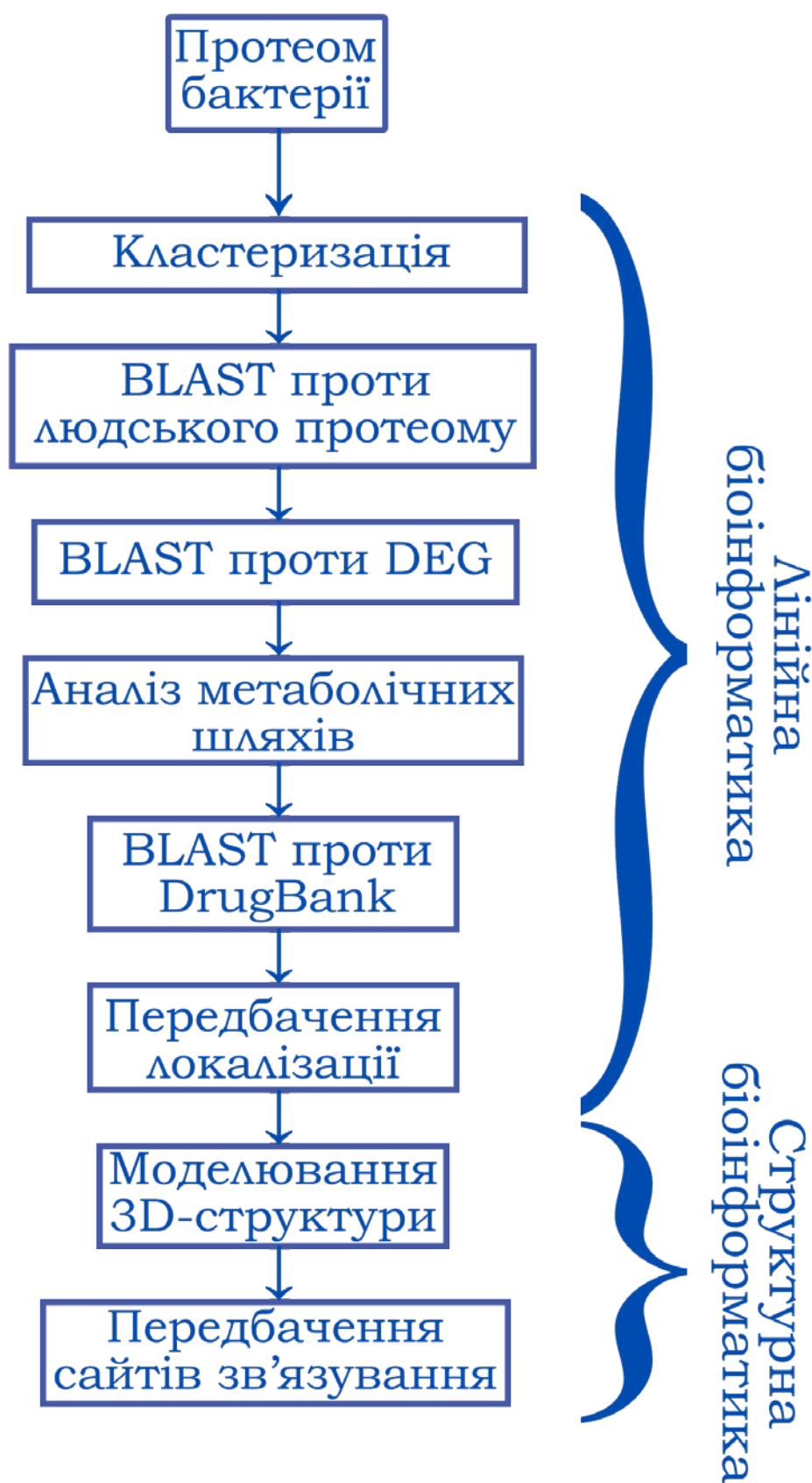
програми. Хоча розмір файлів для одної ітерації передбачення локалізації бактеріальних протеїнів обмежений, сайт пропонує вибір типу організмів (бактерії чи археї), грам-приналежність та формат отриманих результатів. Оскільки *Acinetobacter baumannii* є представником грам-негативних бактерій, ми налаштували параметри відповідним чином. Другим інструментом передбачення субклітинної локалізації протеїнів був CELLO версії 2.5. Ця програма доступна лише у онлайн-варіанті та має меншу кількість параметрів для налаштування, проте може передбачати локалізацію білків і в еукаріотичних клітинах [32]. Останнім інструментом став BUSCA (Bologna Unified Subcellular Component Annotator). Цей онлайн-сервіс може визначати не лише локалізацію протеїнів у мембрані чи цитоплазмі, а й конкретний компартмент для рослин (16 компартментів), тварин та грибів (9 компартментів), а також за рахунок комбінації інших вбудованих інструментів аналізувати послідовність на додаткові особливості структури білка [33]. Отримавши дані від трьох сервісів, ми об'єднали їх результати та залишили для подальшого аналізу лише ті білки, що були передбачені як мембранні в усіх трьох програмах. Наступні етапи дослідження були проведені за допомогою інструментів структурної біоінформатики.

### **2.3 Інструменти структурної біоінформатики для аналізу протеїнів**

Для подальшого аналізу ми мали отримати третинні структури досліджуваних білків. Оскільки для жодного з наших протеїнів не було отримано реальних даних кристалічної будови, ми вирішили зробити її моделювання. Для цього ми використали онлайн-сервіс trRosetta, що дозволяє передбачити третинну структуру білків на основі їх амінокислотної послідовності. Принцип роботи цього сервісу наступний: для вхідної послідовності у форматі FASTA, на основі референсної бази послідовностей білків з відомими структурами, відбувається множинне вирівнювання

послідовностей. Якщо в базі знаходиться гомологічні послідовності, їх структури витягуються з бази даних PDB, вони згодуються нейронній мережі як шаблон разом із множинним вирівнюванням послідовностей для складного багатостадійного процесу передбачення 3D-структури білка. Моделі з найнижчими енергіями проходять декілька додаткових стадій для покращення якості моделі [34]–[36]. Хоча якість отриманих на виході структур відображається у вигляді TM-Score на самому сервісі, ми додатково перевірили їх за допомогою сервісу MolProbity, що оцінює різні параметри моделі [37].

Отримані структури далі було проаналізовано на наявність сайтів зв'язування з низькомолекулярними сполуками. Для цього було використано онлайн-інструмент PrankWeb та два програмні пакети: BIOVIA Discovery Studio та Caver analyst 2.0. На початку, ми використали сервіс PrankWeb, що застосовує метод машинного навчання для пошуку та передбачення сайтів зв'язування лігандів на білках, та визначає деякі їх параметри [38]. Можна використовувати як експериментальні структури, так і змодельовані, а також оцінити ступінь консервативності амінокислотних залишків. Далі, за допомогою програмного пакету BIOVIA Discovery Studio ми перевірили наявність таких сайтів, а Caver analyst 2.0 дозволив оцінити об'єм кишень [39]. Лише білки, що показали наявність сайтів зв'язування в усіх трьох програмах, а також мали відповідні розміри кишень цих сайтів, в кінці можна назвати потенційними новими мембранними мішенями для лікарських засобів.



**Рис. 2.1.** Вибраний алгоритм пошуку нових потенційних мембранних мішеней підходом субтрактивної протеоміки

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Результати застосування інструментів лінійної біоінформатики

На першому етапі ми успішно завантажили протеом *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, який складався із 3680 послідовностей, та референсний протеом людини.

На другому етапі було проведено кластеризацію протеому бактерії. На виході ми отримали 3586 кластерів (більшість з них складалась лише з 1 послідовності), а отже 3586 послідовностей пройшли цей етап.

На третьому етапі ми провели пошук білків бактерії, гомологічних до людських за допомогою програми BLAST+. Ми створили із завантаженого референсного протеому людини кастомну базу даних для програми, і провели BLASTp 3586 послідовностей проти неї. На виході було отримано 1044 послідовності, що є гомологічними до людських білків і були відкинуті, а 2542 послідовності задовольняли умову і були відібрані для наступних етапів дослідження.

На четвертому етапі ми провели пошук незамінних білків патогену за допомогою DEG. На жаль, в базі містилися дані про незамінні білки лише для *Acinetobacter baumannii* ATCC 17987. Також ми звернули увагу на наявність двох списків незамінних білків для цієї бактерії: для середовища Rich Medium (458 послідовностей) та для моделі пневмонії миші (156 послідовностей). Переглянувши дослідження, на основі якого було створено ці списки, ми дійшли висновку, що потрібно провести BLAST проти їх обох [40]. Тому ми завантажили списки у форматі FASTA, створили на їх основі кастомну базу даних BLAST+ та провели BLASTp 2542 послідовностей досліджуваного протеому проти цієї бази. На виході ми отримали 438

послідовностей, що були гомологічними до незамінних послідовностей, а отже аналізувались далі.

На п'ятому етапі був проведений аналіз метаболічних шляхів, у яких беруть участь незамінні білки, негомологічні до людських. Ми завантажили список із 438 послідовностей у форматі FASTA на KAAS та проаналізували отримані результати. Для 105 послідовностей сервер не зміг передбачити метаболічні шляхи, тому ці послідовності ми відкинули одразу. Інші протеїни брали участь в одному чи декількох із 31 унікального для бактерії та 48 спільних із людиною метаболічних шляхів. Серед цих білків, 148 брали участь лише в унікальних метаболічних шляхах, а отже задовольняли умови для проходження до наступних етапів. Більшість із них стосувались біосинтезу ліпополісахаридів чи пептидогліканів, утворення біоплівки, резистентності до  $\beta$ -лактамів, відчуття кворуму та двокомпонентних регуляторних систем.

На шостому етапі за допомогою вбудованого у сервіс DrugBank пошуку мішеней за алгоритмом BLAST, ми відкинули послідовності, що вже відомі як мішені для лікарських препаратів. Ми ідентифікували 71 відому мішень та залишили 77 білків.

На сьомому етапі ми передбачили субклітинну локалізацію білків, що залишилися, за допомогою онлайн-сервісів PSORTb, CELLO та BUSCA. Серед них виявилися 29 цитоплазматичних, 21 мембранний, 1 периплазматичний. Для 26 протеїнів локалізацію в клітині не було однозначно визначено.

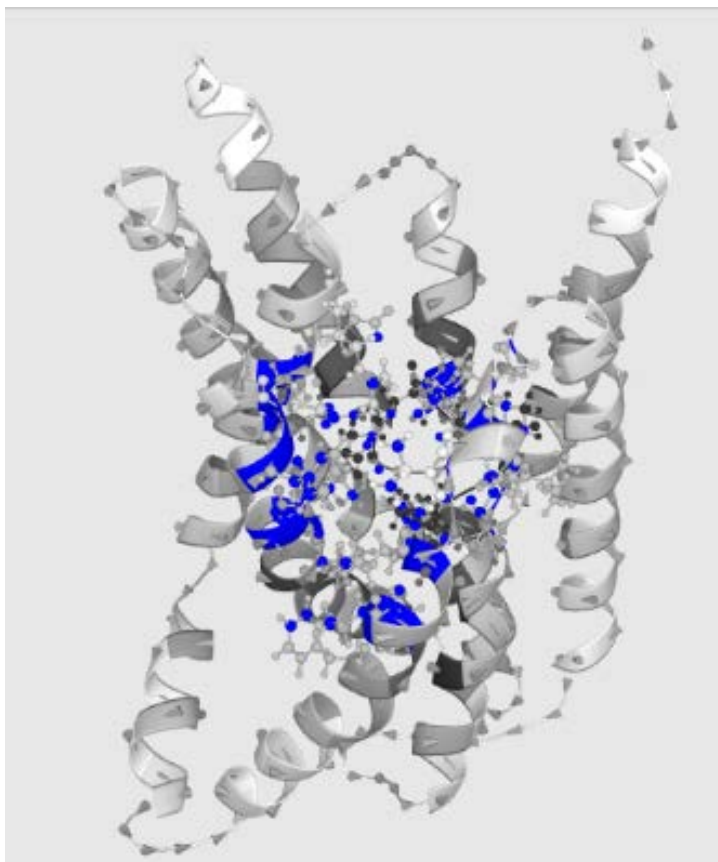
Отже, за допомогою інструментів лінійної біоінформатики ми зменшили вибірку протеїнів, що нас цікавлять, із 3680 до 21, тобто в 175 разів. Цей показник дозволяє оцінити масштаби економії часу в порівнянні з аналізом кожної послідовності одразу методами структурної біоінформатики, та показує ефективність методу субтрактивної протеоміки для пошуку потенційних мішеней для лікарських препаратів.

### 3.2. Результати застосування інструментів структурної біоінформатики

На восьмому етапі дослідження ми змодельовали тривимірні структури 21 протеїну за допомогою сервісу trRosetta. Цей процес зайняв близько одного дня, оскільки одночасно дозволялося завантажувати до 20 послідовностей. На виході, всі моделі мали TM-Score вищий за 0.5, тобто їх топологія була передбачена правильно. Ми додатково перевірили якість моделей за допомогою сервісу MolProbity та звертали найбільшу увагу на MolProbity Score: якщо він вищий за 66%, то модель якісна, і її можна використовувати в подальшому [41]. В нашому випадку, всі моделі мали MolProbity Score вищий за 85%, що додатково підтверджує якість змодельованих структур та ефективність сервісу trRosetta.

На останньому, дев'ятому етапі, ми провели пошук на змодельованих третинних структурах білків сайтів зв'язування з низькомолекулярними сполуками. Для цього ми спочатку використали сервіс PrankWeb, куди по черзі завантажували тривимірні моделі. Сервіс аналізував структуру та консервативність залишків амінокислот і в кінці видавав ймовірні позиції сайтів зв'язування з лігандами. Для кожного сайту окремо визначав достовірність передбачення, кількість амінокислот та консервативність. За допомогою цього сервісу ми відкинули 10 протеїнів. Далі ми використали програмні пакети BIOVIA Discovery studio 2021 та Caver analyst 2.0 для перевірки результатів веб-сервісу та передбачення об'єму та доступності для розчинника порожнин, в яких знаходились визначені сайти. За допомогою цих програм ми відкинули ще п'ять білків, що не мали достатнього доступу до порожнин, або мали завеликі порожнини, що є сайтами зв'язування для високомолекулярних лігандів. В кінці-кінців, ми отримали шість білків, що є

новими, мембранними, незамінними протеїнами, які негомологічні до людських білків, беруть участь в унікальних для бактерії метаболічних



шляхах та мають сайти зв'язування з низькомолекулярними лігандами. Ці шість білків можна назвати потенційними новими мембранними мішенями для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, і є перспективними для подальших досліджень.

**Рис. 3.1.** Передбачена за допомогою сервісу PrankWeb кишеня з сайтом зв'язування білка undecaprenyl-diphosphate phosphatase

### **3.3. Характеристика нових потенційних мембранних мішеней для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606**

Потенційними новими мембранними мішенями для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 є наступні білки: rod

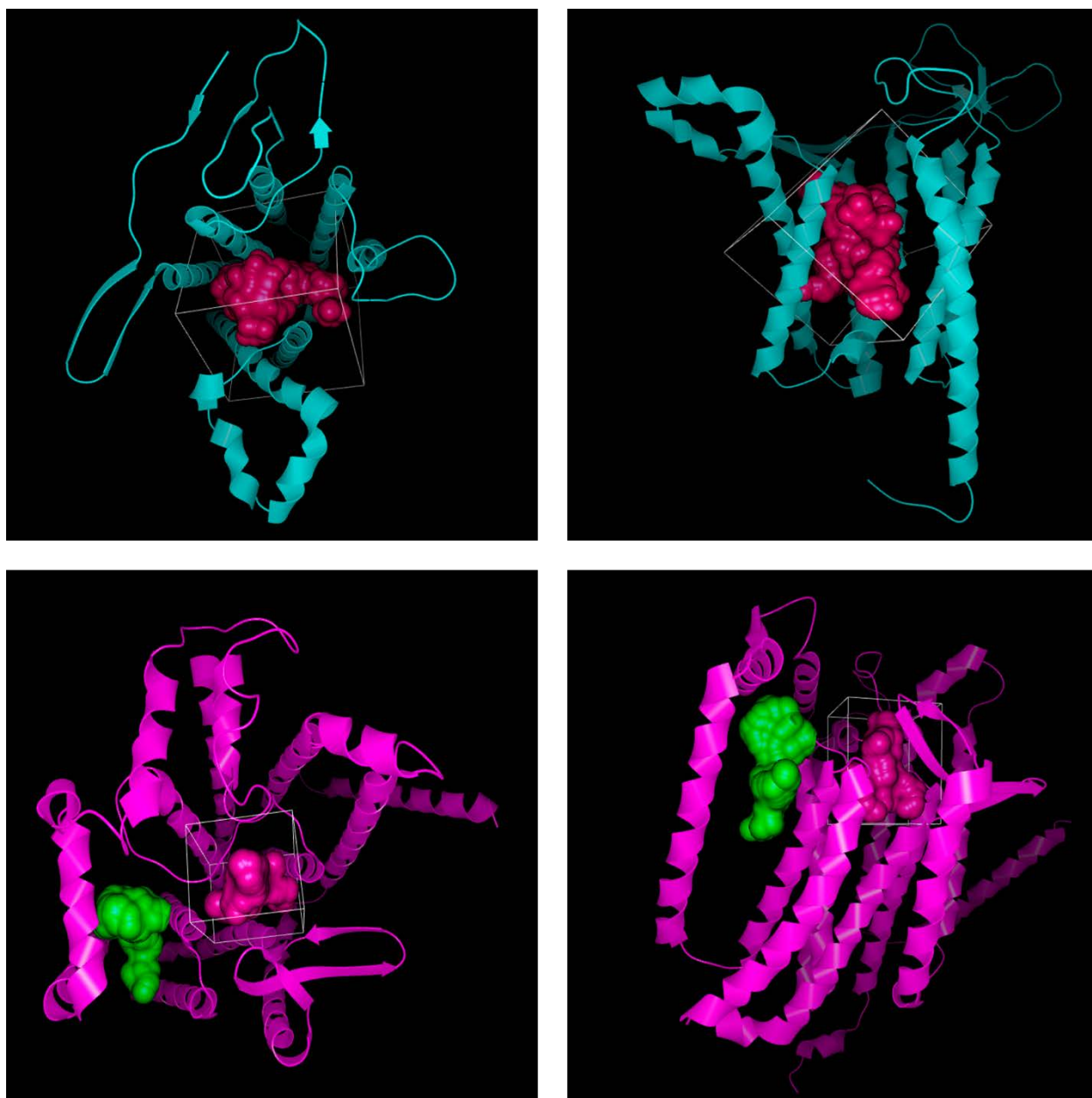
shape-determining protein RodA, DedA family protein, undecaprenyl-diphosphate phosphatase, putative lipid II flippase FtsW, prolipoprotein diacylglyceryl transferase, apolipoprotein N-acyltransferase.

Rod shape-determining protein RodA входить до родини білків SEDS (форма, ріст, поділ, споруляція) та є частиною комплексу Rod. Цей комплекс забезпечує ріст паличкоподібних бактерій за допомогою синтезу пептидоглікану. RodA є полімеразою і відіграє істотну роль у біогенезі клітинної стінки, а отже є перспективною мішенню для лікарських засобів [42], [43]. Вхід до порожнини з сайтом зв'язування цього протеїну знаходиться із екстрацитоплазматичної сторони. Сам сайт є високо консервативним серед різних видів бактерій, містить залишки полярних амінокислот а також сольовий місток [44]. Caver analyst оцінив об'єм порожнини в  $673.3 \text{ \AA}^3$ .

Lipid II flippase FtsW також входить до родини SEDS та є гомологічним до RodA. Раніше вважалося, що він виконує функцію транспорту Ліпиду II, попередника пептидоглікану, через внутрішню мембрану бактерії. Проте останні дослідження доводять, що він також є пептидогліканполімеразою та працює у комплексі з представником пеніцилінзв'язуючих протеїнів класу B, а також є основним членом універсального для бактерій комплексу утворення перегородки клітинної стінки під час поділу клітини [45], [46]. Через це, цей білок є дуже перспективною мішенню. Caver analyst знайшов дві можливих порожнини з сайтом зв'язування, які мають об'єми 392.6 та  $424.5 \text{ \AA}^3$ .

Протеїни з родини DedA є важливими та консервативними мембранними білками, проте залишаються погано охарактеризованими. Є дані, що представники цієї родини можуть забезпечувати резистентність до колістину, є протон-залежними транспортерами та важливі для нормального поділу клітини [47], [48]. PrankWeb оцінив наявність сайту зв'язування із ймовірністю 0.889. Caver analyst передбачив дві порожнини об'ємом 439.9 і  $292.7 \text{ \AA}^3$  поруч одна з одною замість однієї.

Undecaprenyl-diphosphate phosphatase перетворює ундекапреніл-



дифосфат, який є побічним продуктом синтезу пептидоглікану, в ундекапреніл-фосфат, який можна знову використовувати для будівництва бактеріальної клітинної стінки. Доступ до сайту зв'язування білка здійснюється з периплазматичного простору [49]. Caver analyst оцінив об'єм порожнини в  $808.6 \text{ \AA}^3$ .

**Рис. 3.1.** Порожнини білків prolipoprotein diacylglyceryl transferase (верхні) та lipid II flippase FtsW (знизу), передбачені програмою Caver analyst

Prolipoprotein diacylglyceryl transferase каталізує першу реакцію триетапної посттрансляційної модифікації для біосинтезу ліпопротеїнів. Цей протеїн має два входи в гігантську центральну порожнину: передній вхід, що відкривається у периплазматичний простір, і бічний вхід, що відкривається в цитоплазму [50]. Caver analyst оцінив об'єм порожнини в  $1479 \text{ \AA}^3$ .

Apolipoprotein N-acyltransferase також бере участь у посттрансляційній модифікації для синтезу ліпопротеїнів, але вже на третьому етапі. Цей білок відповідає за каталізацію приєднання пальмітату до N-кінця діацильованих аполіпопротеїнів. Caver analyst і PrankWeb знайшли дві кишені поруч одна з одною. Їх об'єми програма оцінила в  $741.5$  і  $676.3 \text{ \AA}^3$ .

Усі ідентифіковані білки мають вирішальне значення для синтезу та функціонування мембран і клітинної стінки, що не дивно, оскільки вони є трансмембранними. Оскільки ліки легше взаємодіють з білками, порожнини активних центрів яких відкриваються назовні, а не в цитоплазму, такі мішені є більш перспективними. Крім того, дія препаратів, що діють на мембранні білки, не залежить від наявності чи відсутності помп, що викачують з бактерії антибіотики, оскільки препарату не потрібно проникати в цитоплазму. Саме тому ідентифіковані в даному дослідженні протеїни є перспективними для подальших досліджень.

### 3.4. Обговорення результатів дослідження

Підхід субтрактивної протеоміки показав себе як доволі швидкий та результативний метод аналізу великих наборів даних. Інформація, наявна у літературі, в цілому підтверджує результати нашого дослідження, оскільки всі знайдені білки є мембранними, виконують специфічні для бактерій функції та незамінні для життєдіяльності патогенів. Однозначно необхідне подальше дослідження протеїнів, які ми визначили як потенційні нові мембранні мішені для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii*

*ATCC 19606*, *in vitro* та *in vivo*. Проте це вже є першим кроком на шляху до розробки нових препаратів проти інфекційних хвороб, спричинених цим патогеном.

Основними перевагами цього підходу є швидкість обробки великих вибірок протеїнів та економія дорогоцінного часу, простота у використанні та варіативність для різних потреб.

На нашу думку, недоліком підходу субтрактивної протеоміки є можливі неточності у визначенні деяких характеристик білків, та неповності інформації в літературі про всі білки, що аналізуються. Наприклад, KAAS не зміг передбачити функції 105 протеїнів, а серед них, імовірно, могли бути ще декілька потенційних мішеней, але поки що ми не маємо про них достатньо інформації. Іншим прикладом є використання незамінних білків для іншого штаму патогену, оскільки для *Acinetobacter baumannii ATCC 19606* такого списку не існує в літературі. І хоча штам *ATCC 17987* досить близький до досліджуваного нами, все одно можливі неточності, і потенційну мішень можна відкинути, а звичайний білок прийняти за незамінний.

Проте, беручи до уваги, що всією інформацією володіти неможливо, і у будь-якого методу є свої недоліки та переваги, ми вважаємо, що підхід субтрактивної протеоміки є ефективним способом швидкого аналізу великих вибірок даних *in silico*, що доповнює скринінг *in vitro* та *in vivo*.

Хотілося б додати, що в цьому дослідженні ми акцентували увагу лише на мембранних мішенях для лікарських препаратів. Оскільки цитоплазматичні білки також можуть бути перспективними для розробки лікарських препаратів, такі мішені теж заслуговують бути розглянуті, але уже не в цьому дослідженні.

На нашу думку, результати дослідження будуть корисними для розробки нових протимікробних препаратів вузького спектру дії, в першу чергу проти *Acinetobacter baumannii*. Перспективність розробки таких препаратів полягає у тому, що резистентність утворюватиметься лише у сприйнятливих до цих препаратів організмів, а постійна наявність таких антибіотиків у

навколишньому середовищі не спричинятиме масового утворення та поширення стійкості. Також такі препарати не будуть порушувати функціонування мікрофлори організму, на відміну від універсальних антибіотиків, які іноді спричиняють такі побічні ефекти.

## ВИСНОВКИ

1. Підхід субтрактивної протеоміки виявився швидким, гнучким та ефективним методом знаходження нових потенційних мішеней для лікарських препаратів, хоч він і є не завжди точним через неповноту наявної інформації.

2. Було виявлено 6 нових потенційних мембранних мішеней для лікарських препаратів проти *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: rod shape-determining protein RodA, DedA family protein, undecaprenyl-diphosphate phosphatase, putative lipid II flippase FtsW, prolipoprotein diacylglycerol transferase, apolipoprotein N-acyltransferase.

3. Показано, що виявлені білки відповідають основним вимогам щоб бути потенційними мішенями: а) негомологічні до людських білків та не беруть участь у метаболічних шляхах, спільних з людськими, б) незамінні для виживання бактерії, в) мають сайти зв'язування з низькомолекулярними сполуками, г) не є гомологічними до вже відомих мішеней.

4. Отримані мішені є перспективними для подальшого дослідження, зокрема для віртуального скринінгу проти бібліотек хімічних сполук. А оскільки було передбачено, що вони є мембранними протеїнами, лікарським препаратам буде легше взаємодіяти з їх активними центрами.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] L. C. S. Antunes, P. Visca, and K. J. Towner, “Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen,” *Pathog. Dis.*, vol. 71, no. 3, pp. 292–301, Aug. 2014, doi: 10.1111/2049-632X.12125.
- [2] J. Garnacho-Montero and R. Amaya-Villar, “Multiresistant Acinetobacter baumannii infections: epidemiology and management.,” *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 4, pp. 332–339, Aug. 2010, doi: 10.1097/QCO.0b013e32833ae38b.
- [3] C. Ayoub Moubareck and D. Hammoudi Halat, “Insights into Acinetobacter baumannii: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen,” *Antibiot. (Basel, Switzerland)*, vol. 9, no. 3, p. 119, Mar. 2020, doi: 10.3390/antibiotics9030119.
- [4] C.-R. Lee *et al.*, “Biology of Acinetobacter baumannii: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, p. 55, Mar. 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
- [5] A. Breij *et al.*, “Do Biofilm Formation and Interactions with Human Cells Explain the Clinical Success of Acinetobacter baumannii?,” *PLoS One*, vol. 5, p. e10732, May 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010732.
- [6] C. M. Harding, S. W. Hennon, and M. F. Feldman, “Uncovering the mechanisms of Acinetobacter baumannii virulence,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 91–102, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrmicro.2017.148.
- [7] S. Ibrahim, N. Al-Saryi, I. M. S. Al-Kadmy, and S. N. Aziz, “Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii as an emerging concern in hospitals,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 48, no. 10, pp. 6987–6998, Oct. 2021, doi: 10.1007/s11033-021-06690-6.
- [8] A. Michalopoulos and M. E. Falagas, “Treatment of Acinetobacter infections.,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 11, no. 5, pp. 779–788, Apr. 2010, doi: 10.1517/14656561003596350.

- [9] M. S. Ramirez, R. A. Bonomo, and M. E. Tolmasky, “Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 5, p. 720, May 2020, doi: 10.3390/biom10050720.
- [10] T. Hiltunen, M. Virta, and L. Anna-Liisa, “Antibiotic resistance in the wild: An ecoevolutionary perspective,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 372, no. 1712, 2017, doi: 10.1098/rstb.2016.0039.
- [11] J. M. Munita and C. A. Arias, “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” *Microbiol. Spectr.*, vol. 4, no. 2, Apr. 2016, doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- [12] “Resistance mechanisms.”  
<https://www.reactgroup.org/toolbox/understand/antibiotic-resistance/resistance-mechanisms-in-bacteria/>.
- [13] S. M. Paul *et al.*, “How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry’s grand challenge,” *Nature reviews. Drug discovery*, vol. 9, no. 3. England, pp. 203–214, Mar. 2010, doi: 10.1038/nrd3078.
- [14] W. Loging, L. Harland, and B. Williams-Jones, “High-throughput electronic biology: mining information for drug discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 3, pp. 220–230, Mar. 2007, doi: 10.1038/nrd2265.
- [15] C. Walsh, “Where will new antibiotics come from?,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 1, no. 1, pp. 65–70, 2003, doi: 10.1038/nrmicro727.
- [16] J. W.-H. Li and J. C. Vederas, “Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?,” *Science*, vol. 325, no. 5937, pp. 161–165, Jul. 2009, doi: 10.1126/science.1168243.
- [17] M. Batool, B. Ahmad, and S. Choi, “A Structure-Based Drug Discovery Paradigm,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 11, p. 2783, Jun. 2019, doi: 10.3390/ijms20112783.
- [18] D. Paul, G. Sanap, S. Shenoy, D. Kalyane, K. Kalia, and R. K. Tekade, “Artificial intelligence in drug discovery and development,” *Drug Discov. Today*, vol. 26, no. 1, pp. 80–93, Jan. 2021, doi:

- 10.1016/j.drudis.2020.10.010.
- [19] J. Lin and J. Qian, “Systems biology approach to integrative comparative genomics,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 4, no. 1, pp. 107–119, Feb. 2007, doi: 10.1586/14789450.4.1.107.
- [20] M. J. Pucci, “Use of genomics to select antibacterial targets,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 71, no. 7, pp. 1066–1072, 2006, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.004>.
- [21] M. A. Huynen and B. B. T.-A. in P. C. Snel, “Gene and context: Integrative approaches to genome analysis,” in *Analysis of Amino Acid Sequences*, vol. 54, Academic Press, 2000, pp. 345–379.
- [22] D. Barh *et al.*, “In silico subtractive genomics for target identification in human bacterial pathogens,” *Drug Dev. Res.*, vol. 72, no. 2, pp. 162–177, Mar. 2011, doi: <https://doi.org/10.1002/ddr.20413>.
- [23] M. Hamidian, L. Blasco, L. N. Tillman, J. To, M. Tomas, and G. S. A. Myers, “Analysis of Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 19606 Reveals Novel Mobile Genetic Elements and Novel Prophage.,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 12, Nov. 2020, doi: 10.3390/microorganisms8121851.
- [24] R. C. Edgar, “Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 19, pp. 2460–2461, Oct. 2010, doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
- [25] C. Camacho *et al.*, “BLAST+: architecture and applications.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 10, p. 421, Dec. 2009, doi: 10.1186/1471-2105-10-421.
- [26] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, Oct. 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [27] H. Luo, Y. Lin, F. Gao, C.-T. Zhang, and R. Zhang, “DEG 10, an update of the database of essential genes that includes both protein-coding genes and noncoding genomic elements.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D574-80, Jan. 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1131.

- [28] H. Ogata, S. Goto, K. Sato, W. Fujibuchi, H. Bono, and M. Kanehisa, “KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 1, pp. 29–34, Jan. 1999, doi: 10.1093/nar/27.1.29.
- [29] Y. Moriya, M. Itoh, S. Okuda, A. C. Yoshizawa, and M. Kanehisa, “KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. Web Server issue, pp. W182-5, Jul. 2007, doi: 10.1093/nar/gkm321.
- [30] D. S. Wishart *et al.*, “DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D1074–D1082, Jan. 2018, doi: 10.1093/nar/gkx1037.
- [31] N. Y. Yu *et al.*, “PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 13, pp. 1608–1615, Jul. 2010, doi: 10.1093/bioinformatics/btq249.
- [32] C.-S. Yu, Y.-C. Chen, C.-H. Lu, and J.-K. Hwang, “Prediction of protein subcellular localization.,” *Proteins*, vol. 64, no. 3, pp. 643–651, Aug. 2006, doi: 10.1002/prot.21018.
- [33] C. Savojardo, P. L. Martelli, P. Fariselli, G. Profiti, and R. Casadio, “BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. W1, pp. W459–W466, Jul. 2018, doi: 10.1093/nar/gky320.
- [34] J. Yang, I. Anishchenko, H. Park, Z. Peng, S. Ovchinnikov, and D. Baker, “Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 117, no. 3, pp. 1496 LP – 1503, Jan. 2020, doi: 10.1073/pnas.1914677117.
- [35] Z. Du *et al.*, “The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction.,” *Nat. Protoc.*, vol. 16, no. 12, pp. 5634–5651, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41596-021-00628-9.
- [36] H. Su *et al.*, “Improved Protein Structure Prediction Using a New Multi-Scale Network and Homologous Templates,” *Adv. Sci.*, vol. 8, no. 24, p.

- 2102592, Dec. 2021, doi: <https://doi.org/10.1002/adv.202102592>.
- [37] C. J. Williams *et al.*, “MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation,” *Protein Sci.*, vol. 27, no. 1, pp. 293–315, Jan. 2018, doi: 10.1002/pro.3330.
- [38] L. Jendele, R. Krivak, P. Skoda, M. Novotny, and D. Hoksza, “PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. W1, pp. W345–W349, Jul. 2019, doi: 10.1093/nar/gkz424.
- [39] A. Jurcik *et al.*, “CAVER Analyst 2.0: analysis and visualization of channels and tunnels in protein structures and molecular dynamics trajectories,” *Bioinformatics*, vol. 34, no. 20, pp. 3586–3588, Oct. 2018, doi: 10.1093/bioinformatics/bty386.
- [40] N. Wang, E. A. Ozer, M. J. Mandel, and A. R. Hauser, “Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung,” *MBio*, vol. 5, no. 3, pp. e01163-14, Jun. 2014, doi: 10.1128/mBio.01163-14.
- [41] I. Koleiev *et al.*, “Identification of membrane proteins as potential drug targets in *Escherichia coli* ATCC 25922 using in silico approaches,” *Biopolym. Cell*, vol. 36, pp. 348–357, Oct. 2020, doi: 10.7124/bc.000A38.
- [42] K. Emami *et al.*, “RodA as the missing glycosyltransferase in *Bacillus subtilis* and antibiotic discovery for the peptidoglycan polymerase pathway,” *Nat. Microbiol.*, vol. 2, p. 16253, Jan. 2017, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.253.
- [43] A. J. Meeske *et al.*, “SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases,” *Nature*, vol. 537, no. 7622, pp. 634–638, 2016, doi: 10.1038/nature19331.
- [44] M. Sjodt *et al.*, “Structure of the peptidoglycan polymerase RodA resolved by evolutionary coupling analysis,” *Nature*, vol. 556, no. 7699, pp. 118–121, Apr. 2018, doi: 10.1038/nature25985.
- [45] T. Mohammadi *et al.*, “Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked

- cell wall precursors across the membrane,” *EMBO J.*, vol. 30, no. 8, pp. 1425–1432, Apr. 2011, doi: 10.1038/emboj.2011.61.
- [46] A. Taguchi *et al.*, “FtsW is a peptidoglycan polymerase that is functional only in complex with its cognate penicillin-binding protein,” *Nat. Microbiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 587–594, 2019, doi: 10.1038/s41564-018-0345-x.
- [47] V. Tiwari *et al.*, “A *Klebsiella pneumoniae* DedA family membrane protein is required for colistin resistance and for virulence in wax moth larvae,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 24365, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-03834-3.
- [48] P. R. Panta *et al.*, “A DedA Family Membrane Protein Is Required for *Burkholderia thailandensis* Colistin Resistance,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 2532, Nov. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02532.
- [49] M. El Ghachi *et al.*, “Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 1078, Mar. 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03477-5.
- [50] G. Mao *et al.*, “Crystal structure of *E. coli* lipoprotein diacylglyceryl transferase,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 10198, Jan. 2016, doi: 10.1038/ncomms10198.